

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК –  
ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ПУШКИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

# РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

22–26 мая 2023 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией  
А.В. Бережнова, В.П. Зинченко

Пушино  
2023

УДК 576.3  
ББК 28.05  
Р 45

Состав научного оргкомитета:  
д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель,  
к.б.н. *Бережнов А.В.*, к.б.н. *Федотова Е.И.*,  
чл.-корр. РАН, проф. *Колесников С.С.*

Локальный оргкомитет:  
к.б.н. *Надеев А.Д.*, к.б.н. *Мальцева В.Н.*, к.б.н. *Теплов И.Ю.*,  
к.б.н. *Гайдин С.Г.*, к.б.н. *Косенков А.М.*, *Ларюшкин Д.П.*, *Крицкая К.А.*

**Р45** **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. /**  
Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов:  
Типография Пятый Формат, 2023. – 381 с.

ISBN 978-5-6049994-1-7 (Т. 1)  
ISBN 978-5-6049994-0-0

С 22 по 26 мая 2023 г. в г. Пущино проходила Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены тексты 152 статей по материалам докладов участников конференции.

В первый том вошли разделы:

- общие вопросы сигнализации;
- кальциевая сигнализация;
- сигнализация в мышечных клетках и нейронах;
- внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация;
- сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика.

Второй том содержит разделы:

- сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов;
- сигнализация в синапсе;
- сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
- действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации;
- сигнализация в растительных клетках и у прокариот;
- особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках;
- новые подходы и методы клеточных исследований.

УДК 576.3  
ББК 28.05

ISBN 978-5-6049994-1-7 (Т. 1)  
ISBN 978-5-6049994-0-0

© Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2023

# СОДЕРЖАНИЕ

## Том 1

### ОБЩИЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ

- РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В АКТИВАЦИИ  
В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТОВ  
*Болдова А.Е., Хамитов Д.Р., Григорова И.Л., Свеиникова А.Н.* 21
- ДЕЛЕЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SATB1  
ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ  
ПРОТЕИНАЗ В КЛЕТКАХ КОРЫ МОЗГА И КОРРЕЛИРУЕТ  
С ГИПЕРВОЗБУЖДЕНИЕМ НЕЙРОНАЛЬНЫЙ СЕТИ  
*Варламова Е.Г., Рогачев В.В., Тарабыкин В.С.,  
Бабаев А.А., Туровский Е.А.* 25
- ФУНКЦИИ КАТИОНА НИТРОЗОНИЯ NO<sup>+</sup>  
В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ  
*Васильева С.В.* 31
- ПОКАЗАТЕЛИ ЭСТЕРАЗНОГО СТАТУСА КАК  
БИОМАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ПРОГНОЗА COVID-19  
*Воронина П.А., Белинская Д.А., Войтенко Н., Гончаров Н.В.* 37
- АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ  
ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ p53 И E2F1 В КЛЕТКАХ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ  
ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА  
*Дзряян В.А., Гузенко В.В., Батальщикова С.А.* 43
- МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ  
РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА СЕРДЦА  
*Егоров Ю.В.* 49
- УЧАСТИЕ РЕЦЕПТОРА CD14 В АКТИВАЦИИ  
КЛЕТОК КРОВИ АГОНИСТАМИ TLR4 и TLR2  
*Зубова С.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р.* 53
- ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ HSP40 В КЛЕТКАХ КРОВИ  
ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ  
*Кандалова О.В., Елистратова И.В., Ляпон А.О.* 58
- ЭКТОПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ВКУСОВЫХ И  
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ  
ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА И ЛИНИИ MIN6  
*Коваленко Н.П., Кабанова Н.Н., Копылова Е.Е.,  
Ковалицкая Ю.А., Быстрова М.Ф., Масулис И.С.* 64

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ЭКСПРЕССИЯ МИОКАРДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ БАРИАТРИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ – ПРОДОЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ ЖЕЛУДКА <i>Корнюшин О.В., Деркач К.В., Бахтюков А.А., Сонин Д.Л., Казантаева М., Капустина П.А., Шпаков А.О.</i>	71
БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА <i>Корф Е.А., Новожилов А.В., Воронина П.А., Войтенко Н.Г., Ганем А., Хабиб С., Гончаров Н.В.</i>	77
ВЛИЯНИЕ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МОЗГА ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ НА ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ <i>Крамарова Л.И., Зиганин Р.Х., Михайлова Г.З., Утешев В.К., Гахова Э.Н.</i>	81
НЕСТЕРОИДНЫЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ АГЕНТ ИНДОМЕТАЦИН МОДУЛИРУЕТ ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ <i>Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Бадюлина В.И.</i>	87
АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА РАЗНЫХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ СТРЕТОЗОТАЦИНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА В КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ <i>Новикова Е.В., Филиппов Ю.А., Степанов А.В., Кубасов И.В., Сухов И.Б., Чистякова О.В., Добрецов М.Г.</i>	92
ПРИНЦИПЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СЕТИ <i>Ратушняк А.С., Хусаинов Р.Р., Проскура А.Л.</i>	96
ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ АТР ВО ВКУСОВОЙ ПОЧКЕ <i>Рогачевская О.А., Черкашин А.П., Хохлов А.А., Колесников С.С.</i>	102
ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШИ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ НЕ ВООСТАНАВЛИВАЕТСЯ ЗА НЕДЕЛЮ РЕАДАПТАЦИИ <i>Россомахин Р.А., Дмитриева С.А., Нуруллин Л.Ф., Тяпкина О.В.</i>	106
ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭНДОЦИТОЗА НА РАЗВИТИЕ РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ <i>Степанов А.В., Филиппов Ю.А., Новикова Е.В., Добрецов М.Г., Кубасов И.В.</i>	110

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА  
ЧЕЛОВЕКА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ  
АКТИВНОСТЬ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК  
*Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С.,  
Ужвиюк С.В., Заморина С.А.* 115

ФИЗИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ САМОК КРЫС ВО ВРЕМЯ  
БЕРЕМЕННОСТИ ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ  
СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ АРТЕРИЙ ПОЧКИ  
НОВОРОЖДЕННОГО ПОТОМСТВА  
*Швецова А.А., Борзых А.А., Кузьмин И.В., Кирюхина О.О.,  
Селиванова Е.К., Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С.* 120

## **КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ**

КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ И КАЛЬЦИЙ-СЕНСОРНЫЕ БЕЛКИ  
В РЕГУЛЯЦИИ ЭКЗО-ЭНДОЦИТОЗА ВЕЗИКУЛ  
*Нуруллин Л.Ф., Алмазов Н.Д., Волков Е.М.* 126

ИНСУЛИН АКТИВИРУЕТ КАЛЬЦИЕВУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ  
В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
КЛЕТКАХ ОТ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОГО ДОНОРА  
*Бондарев А.Д., Чечехин В.И., Кулбьякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.* 130

СТЕПЕНЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ЗАПАСА  
ОПРЕДЕЛЯЕТ ОТВЕТЫ ЦИТОЗОЛЬНОГО  $Ca^{2+}$   
НА ПОВТОРНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ КЛЕТОК НЕК-293  
*Каймачников Н.П., Соколов В.В., Колесников С.С.* 133

МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА В  
СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ  
*Коробкина Ю.Д., Пантелеев М.А., Свешикова А.Н.* 139

ФЛУКТУАЦИИ  $[Ca^{2+}]$ , МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА  
И NADH В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ  
КОРТЕКСА МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ GCaMP6f  
*Лисина О.Ю., Згодова А.Е., Бакаева З.В., Шарипов Р.Р., Сурин А.М.* 143

L,D-ПЕПТИДАЗА БАКТЕРИОФАГА 3 *AEROMONAS* И КАЛЬЦИЕВАЯ  
РЕГУЛЯЦИЯ ФАГОЛИЗИСА  
*Микулинская Г.В., Чернышов С.В., Мусаева А.А.,  
Тарлачков С.В., Азев В.Н., Прохоров Д.А.* 148

2-АМИНОЭТОКСИДИФЕНИЛ-БОРАТ МОДУЛИРУЕТ  
ВХОД  $Ca^{2+}$  В МАКРОФАГАХ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ  
ГЛУТОКСИМОМ И МОЛЛИКСАНОМ  
*Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г.,  
Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И., Симонян А.О.* 153

КИНЕТИКА ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА,  
ФЕНОТИПЫ КЛЕТОК  
*Миндукшеев И.В., Добрылко И.А., Фок Е.М., Волкова А.А., Гамбарян С.П.* 158

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ ВЛИЯЮТ НА  
РЕГУЛЯТОРНОЕ УМЕНЬШЕНИЕ ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ  
ПОСРЕДСТВОМ АКТИВАЦИИ P2X ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ  
*Небесная К.С., Рустамова С.И., Махмудов А.Р., Сабиров Р.З., Баев А.Ю.* 164

ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ  
МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛИНГА  
В МСК В ОТВЕТ НА ПАРАТГОРМОН  
*Николаев М.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Воронцова М.В.* 170

ОСЦИЛЛЯЦИИ КОЖНОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ, КАЛЬЦИЯ  
И NO В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ  
САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У МЫШЕЙ  
*Серов Д.А., Асташев М.Е., Шайхутдинова Э.Р.,  
Северюхина М.С., Танканага А.В.* 174

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ СИГНАЛЬНЫХ  
СИСТЕМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И ФОСФОЛИПАЗЫ С В  
ПТГ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК  
*Усачев В.А., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.,  
Волошин Н.С., Зубарев И.В., Николаев М.Ю., Воронцова М.В.* 180

СЕНСИТИЗАЦИЯ ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК К  
НОРАДРЕНАЛИНУ – КЛЮЧЕВОЙ ЭТАП РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ  
ГИПЕРТЕНЗИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОЖИРЕНИЕМ  
*Чечехин В.И., Иванова А.М., Кулебякин К.Ю.,  
Калинина Н.И., Тюрин-Кузьмин П.А.* 182

## **СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ И НЕЙРОНАХ**

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В  
МИОКАРДЕ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКРОТАЛИНА  
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ IGF-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ  
В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
*Адашева Д.А., Артемьева М.М., Иванова А.Д.,  
Медведева Н.А., Катруха А.Г., Серебряная Д.В.* 188

МАРКЕРЫ КАТАБОЛИЧЕСКИХ И АНАБОЛИЧЕСКИХ  
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ  
МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ 21-СУТОЧНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ  
*Белова С.П., Зарипова К.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.* 192

ПОИСК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ГЕННОГО ОТВЕТА НА 6-СУТОЧНУЮ «СУХУЮ» ИММЕРСИЮ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА <i>Борзых А.А., Махновский П.А., Вепхвадзе Т.Ф., Леднев Е.М., Орлов О.И., Томиловская Е.С., Попов Д.В.</i>	194
ИССЛЕДОВАНИЕ RAPP-A-СПЕЦИФИЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА IGFVR-4 В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА <i>Гуцеваров Д.А., Дя Г.А., Артемьева М.М., Владыченская Е.А., Медведева Н.А., Серебряная Д.В.</i>	199
ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ SERCA ПРИ НЕДЕЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И УТОМЛЯЕМОСТЬ <i>M. SOLEUS</i> КРЫС W1STAR <i>Зарипова К.А., Белова С.П., Шарло К.А., Львова И.Д., Тыганов С.А., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л.</i>	207
РОЛЬ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КАНАЛОВ SERCA В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛИНГА ПРИ ТРЕХСУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ КРЫС <i>Зарипова К.А., Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л.</i>	208
ЭНДОКРИННАЯ ФУНКЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ <i>Захарова А.Н., Милованова К.Г., Орлова А.А., Дьякова Е.Ю., Калининкова Ю.Г., Коллантай О.В., Капилевич Л.В., Чибалин А.В.</i>	211
ПРИЖИЗНЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ПОСЛЕДСТВИЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА МЫШИ: ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ <i>Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Шарипов Р.Р., Бакаева З.В., Попова И.Ю., Пинелис В.Г., Сурин А.М.</i>	215
ИДЕНТИФИКАЦИЯ FMRF-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ В РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЕ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ТРЕМАТОД (PLATYHELMINTHES) <i>Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д., Кучин А.В., Яшин В.А., Мочалова Н.В., Теренина Н.Б., Гордеев И.И., Митьковский Д.Е., Никогосян М.А., Петросян Р.А., Мовсесян С.О.</i>	221
ВВЕДЕНИЕ НИФЕДИПИНА ВЛИЯЕТ НА РАЗВИТИЕ УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНЫХ МЫШЦ НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ <i>Львова И.Д., Шарло К.А., Сидоренко Д.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.</i>	225

- ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНОВ СЕМЕЙСТВА HSP70 НА  
 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СКЕЛЕТНЫХ  
 МЫШЦ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
*Махновский П.А., Кукушкина И.В., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Попов Д.В.* 227
- СОДЕРЖАНИЕ РАКТ В КЛЕТКАХ C2C12 ПРИ  
 ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ И ГИПЕРГЛИКЕМИИ  
*Милованова К.Г., Дьякова Е.Ю., Черных А.Е., Капилевич Л.В.* 231
- РОЛЬ КАНАЛОВ PIEZO1 В ПРОВЕДЕНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО  
 СИГНАЛА К mTORC1-ЗАВИСИМОМУ СИГНАЛЬНОМУ  
 ПУТИ В ИЗОЛИРОВАННОЙ *M. SOLEUS* КРЫСЫ  
*Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Сергеева К.В.,  
 Калашников В.Е., Шенкман Б.С.* 233
- РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА  
 СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ  
*Сорокина Д.М., Шайдуллоев И.Ф., Ситдииков Ф.Г., Ситдиикова Г.Ф.* 236
- СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВЕ  
 АЦЕДАНА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА  
 В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И КЛЕТКАХ  
*Таржанов И.А., Шарипов Р.Р., Згодова А.А.,  
 Некрасова А.А., Бакаева З.В., Сурин А.М.* 241
- ВЛИЯНИЕ EGCG НА РЕГУЛЯТОРНУЮ ФУНКЦИЮ  
 ТРОПОМИОЗИНА С МУТАЦИЕЙ E150A  
*Тишкова М.В., Богданов А.Л., Сиренко В.В.,  
 Карпичева О.Е., Боровиков Ю.С.* 247
- ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА УГНЕТАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
 ГАМК НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ МИОТРУБОК В КУЛЬТУРЕ  
*Токмакова А.Р., Сибгатуллина Г.В., Гилиждинова К.Р., Маломуж А.И.* 249
- ГЛУТАМАТ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЯ pH В ЦИТОЗОЛЕ,  
 ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ И МАТРИКСЕ  
 МИТОХОНДРИЙ НЕЙРОНОВ ИЗ МОЗГА КРЫС  
*Шарипов Р.Р., Жердев А.А., Савинкова И.Г., Горбачева Л.Р.,  
 Пинелис В.Г., Некрасова А.А., Бакаева З.В., Сурин А.М.* 254
- ВВЕДЕНИЕ МИТОКИНА MOTS-C ПРЕДОТВРАЩАЕТ РОСТ  
 УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНЫХ МЫШЦ НА ФОНЕ  
 7-СУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ  
*Шарло К.А., Львова И.Д., Сидоренко Д.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.* 259



## **ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ**

- ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ФАКТОРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА**  
*Ганцова Е.А., Табеева Г.И., Стрелков М.С., Бутрим В.А., Шевцова Ю.С., Ибрагимова А.Г., Асатурова А.В., Силачев Д.Н., Фатхудинов Т.Х., Вишнякова П.А.* 262
- НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА**  
*Калюжная Ю.Н., Силачев Д.Н., Демьяненко С.В.* 266
- ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ**  
*Кулебякина М.А., Бутузова Д.А., Басалова Н.А., Арбатский М.С., Клычников О.И., Ефименко А.Ю.* 272
- ТИРОЗОЛ ИНДУЦИРУЕТ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***  
*Носкова Е.О., Маркова О.В., Кнорре Д.А., Галкина К.В.* 274
- РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПОЧЕЧНЫМ ЭПИТЕЛИЕМ, В ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧКИ**  
*Певзнер И.Б., Ломакина А.К., Зорова Л.Д., Шевцова Ю.А., Горюнов К.В., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю.* 278
- РЕГУЛЯЦИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОГЛИИ И МАКРОФАГОВ И АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИГНАЛОВ ЭКЗОСОМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**  
*Ратушняк М.Г., Шапошникова Д.А., Высоцкая О.В.* 283
- ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИНДУКЦИЮ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ И ЗАЩИТУ КЛЕТОК ГИППОКАМПА ОТ ИШЕМИИ**  
*Туровский Е.А., Варламова Е.Г., Буров А.А., Горюнов К.В., Шевцова Ю.А., Силачев Д.Н.* 289
- ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**  
*Чернышев В.С., Яценко А., Кларк И., Скляр М.* 296

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЭКЗОСОМ ПРИ СТАРЕНИИ  
МУЛЬТИПОТЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ИХ  
АДИПОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

*Чехчина Е.С., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю.,  
Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Басалова Н.А.,  
Александровичкина Н.А., Арбатский М.С., Виговский М.А.,  
Зиновьева А.А., Бахчинян Е., Ефименко А.Ю.*

301

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ  
ЧЕЛОВЕКА С КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ ПОСРЕДСТВОМ  
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

*Якимова А.С., Непша О.С., Гаврилов М.Ю., Романов Е.А.,  
Шевцова Ю.А., Силачев Д.Н., Макарова Н.П., Калинина Е.А.*

308

**СИГНАЛИЗАЦИЯ УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ.  
БИОЭНЕРГЕТИКА**

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ  
VDAC1 ИНГИБИРУЕТ РАЗВИТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  
ДИСФУНКЦИИ ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

*Белослудцев К.Н., Старинец В.С., Серов Д.А.,  
Ильзоркина А.И., Белослудцева Н.В.*

311

ВОЗРАСТНАЯ ДИСФУНКЦИЯ КРЕАТИНКИНАЗНОГО ЧЕЛНОКА  
В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА АССОЦИИРОВАНА С  
НАРУШЕНИЕМ МЯГКОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ МИТОХОНДРИЙ  
И КОНТРОЛИРУЕМОЙ ПРОДУКЦИЕЙ  
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

*Высоких М.Ю., Виговский М.А., Марей М.В., Григорьева О.А.,  
Вепхвадзе Т.Ф., Курочкина Н.С., Манухова Л.А.,  
Ефименко А.Ю., Попов Д.В., Скулачев В.П.*

315

МОДУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА ЗА СЧЕТ  
АКТИВАЦИИ Nrf2

*Гуреев А.П., Попов В.Н.*

318

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  $Ca^{2+}$ -НЕЗАВИСИМОЙ  
ФОСФОЛИПАЗЫ *iPLA2* В ИНДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  
ПОРЫ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫМИ АЦИЛКАРНИТИНАМИ

*Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынник В.В.*

324

- АДАПТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА 1-КАРБОКСИ  
(1-N-(АЦЕТИЛАМИД)-2-(3',5'-ДИ-ТРЕР-БУТИЛ-  
4-ГИДРОКСИ-ФЕНИЛ)-ПРОПИОНАТА КАЛИЯ  
*Жигачева И.В., Крикунова Н.И.* 328
- ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  
ДНК НА МЕТАБОЛИЗМ АТФ В ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ  
*Казаков М.С., Шитикова Е.Ю., Попов Д.Ю.,  
Погонялова М.Ю., Кузнецова Е.А., Винокуров А.Ю.* 333
- ВЛИЯНИЕ АСТАКСАНТИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ  
ДИНАМИКИ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ  
ПРИ ИЗОПРОТЕРИНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ  
*Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Одинокова И.В.,  
Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.* 338
- ВСПЫШКИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ  
ПРИ СТРЕССЕ В ФИБРОБЛАСТАХ С МУТАЦИЕЙ,  
СВЯЗАННОЙ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА  
*Крицкая К.А., Федотова Е.И., Ларюшкин Д.П., Бережнов А.В.* 345
- ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ GLN263LEU В СУБЪЕДИНИЦЕ  
БЕТА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФ-СИНТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ  
НА СКОРОСТЬ ГИДРОЛИЗА НИЗКИХ  
КОНЦЕНТРАЦИЙ АТФ В ПРИСУТСТВИИ АДФ  
*Лапашина А.С., Галкина К.В., Маркова О.В., Кнорре Д.А., Фенюк Б.А.* 348
- НАБЛЮДЕНИЯ ЗА УРОВНЕМ АТФ В МИТОХОНДРИЯХ  
И ЦЕЛЫХ КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ПОМОЩИ  
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ  
*Лапашина А.С., Галкина К.В., Маркова О.В., Кнорре Д.А., Фенюк Б.А.* 352
- ИНТРАНАЗАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ,  
СНИЖАЮЩАЯ ПОТЕРЮ НЕЙРОНОВ, КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ  
ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
*Миронова Г.Д., Белослудцева Н.В., Жданова Д.Ю., Бобкова Н.В.* 357
- ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ  
И АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ  
НЕПРЕРЫВНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ  
*Мишуков А.А., Мартьянов А.А., Свешникова А.Н.* 359
- УСТОЙЧИВАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ  
ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ У ДРОЖЖЕЙ  
*Муравьев Г.С., Кашко Н.Д., Кнорре Д.А.* 364

РЕГУЛЯЦИЯ ЧИСЛА КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК  
У ДРОЖЖЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ  
ДНК С ОБШИРНЫМИ ДЕЛЕЦИЯМИ  
*Потапенко Е.Ю., Кашко Н.Д., Кнорре Д.А.* 367

ОСОБЕННОСТИ СТИМУЛЯЦИИ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ  
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ  
КАТИОННЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И  
 $\alpha,\omega$ -ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
*Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова Е.К., Дубинин М.В.* 371

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО  
ФАКТОРА Nr $\tau$ 2 В ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТАХ  
*Стельмацук О.А., Абрамов А.Ю.* 376

## Том 2

### СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ИОННЫХ КАНАЛОВ И РЕЦЕПТОРОВ

АНГИОТЕНЗИН-II РЕГУЛИРУЕТ ГИПОКСИЧЕСКУЮ  
ВАЗОКОНСТРИКЦИЮ В КРОВЕНОСНОМ РУСЛЕ  
ЛЁГКИХ У КРЫС С МОНОКРОТАЛИНОВОЙ  
ЛЁГЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ  
*Абрамов А.А., Просвирнин А.В., Лакомкин В.Л., Кузьмин В.С.* 384

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНДОГЕННЫХ  
КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ И  
РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫМ  
ВХОДОМ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ НЕК293  
*Григорьева Е.Р., Номеровская М.А., Решетин Д.С., Колесников Д.О.,  
Глушанкова Л.Н., Казначеева Е.В., Шалыгин А.В.* 390

КАЛИЕВЫЙ ТОК ВХОДЯЩЕГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ УЧАСТВУЕТ В  
ПРОАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА ПОЛЫХ ВЕН,  
ВЫЗВАННОЙ АЛЬФА-АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ  
*Иванова А.Д., Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В.,  
Пустовит О.Б., Кузьмин В.С.* 394

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ НА ОКСИДАЗНУЮ  
АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ  
*Коровина М.О., Филина Ю.В., Сафронова В.Г.,  
Хаертынов К.С., Габдулхакова А.Г.* 399

ДЛИТЕЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ РЕЗИДЕНТНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК  
ПОДАВЛЯЕТ АВТОМАТИЮ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА  
СЕРДЦА ПОСРЕДСТВОМ ГИСТАМИНОВЫХ Н1 РЕЦЕПТОРОВ  
*Кузьмин В.С., Воронина Я.А., Абрамов А.А., Кархов А.М., Федоров А.В.* 404

УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫХ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ  
В РЕГУЛЯЦИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ  
АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА  
*Ларюшкин Д.П., Теплов И.Ю., Косенков А.М., Гайдин С.Г., Зинченко В.П.* 409

АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ  
СИНАПСЕ ДИАФРАГМЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ  
ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА  
*Сибгатуллина Г.В., Хузахметова В.Ф., Ценцевичский А.Н., Бухараева Э.А.* 416

РОЛЬ ОРФАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ БЕЛКА  
РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕСТОСТЕРОНА  
*Слепнев А.А., Попова Н.М., Сеидкулиева А.А.,  
Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.* 421

ДИНАМИКА ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ PAR1 РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ  
*Сысоев М.Д., Свешникова А.Н.* 425

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКОЙ  
ТЕМПЕРАТУРЫ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ ВЗРЫВ ГРАНУЛОЦИТОВ  
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ  
*Тихонова И.В., Дюкина А.Р., Косякова Н.И., Сафронова В.Г.* 429

СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В РАННЕМ  
РАЗВИТИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ  
*Фролова В.С., Иванова А.Д., Конорова М.С.,  
Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А.* 433

## **СИГНАЛИЗАЦИЯ В СИНАПСЕ**

ВКЛАД ДВУХ ИСТОЧНИКОВ ПУРИНОВ В РЕГУЛЯЦИЮ КВАНТОВОЙ  
СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ  
*Балезина О.П., Митева А.С., Гайдуков А.Е.* 439

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ  
ПЕРЕДАЧИ ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ  
СИНАПСАХ МЫШИ  
*Гайдуков А.Е., Молчанова А.И.* 444

КО-ТРАНСМИССИЯ КАК ФАКТОР СИНАПТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА  
*Маломуж А.И., Федоров Н.С.* 450

- ЭФФЕКТЫ ПРОНЕЙРОТРОФИНА BDNF И ПРОДОМЕНА BDNF В  
НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ ТРЕБУЮТ  
ОБЯЗАТЕЛЬНОГО УЧАСТИЯ РЕЦЕПТОРОВ TRKB И СОРТИЛИНА  
*Потапова Д.А., Правдивцева Е.С., Богачева П.О.* 453
- ИНСУЛИН КАК МОДУЛЯТОР ПЕРЕСТРОЕК В МАКРОКОМПЛЕКСАХ  
ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ ГИППОКАМПА  
*Проскура А.Л., Вечкапова С.О., Ратушняк А.С.* 458
- ОПОСРЕДОВАННОЕ ЧЕРЕЗ КГРП УВЕЛИЧЕНИЕ РАЗМЕРОВ  
КВАНТОВ АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ 2-АГ  
В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ  
*Тарасова Е.О., Чернышев К.А., Богачева П.О., Базелина О.П.* 463
- СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА.  
АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ**
- ОСОБЕННОСТИ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА И  
УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ МЫШИ  
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ РЕЖИМА КОРМЛЕНИЯ  
*Дмитриева С.А., Краснова А.Н., Вологин Д.С., Пономарева А.А.* 469
- КОНЦЕНТРАЦИОННО-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА  
СМЕРТИ DR5 РЕЦЕПТОР-СЕЛЕКТИВНЫМ ВАРИАНТОМ  
ЦИТОКИНА TRAIL DR5-В В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ  
*Исакова А.А., Антипова Н.В., Мазур Д.В., Гаспарян М.Э., Яголович А.В.* 474
- МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФРАГМЕНТОВ S- И  
M- БЕЛКОВ SARS-COV-2 У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ  
И БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА  
*Кулиш А.Д., Дюкина А.Р., Тихонова И.В.* 478
- НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ NIF  
ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗ *IN VIVO*  
*Митрошина Е.В., Гавриш М.С., Корокозова М.В.,  
Стрелкова П.Л., Ведунова М.В.* 482
- NO-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСПРЕССИИ p53 И АПОПТОЗА  
В ДОРЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЯХ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ  
ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА  
*Нвосу Ч.Д., Родькин С.В.* 486

ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ В МЕХАНИЗМАХ КЛЕТОЧНОЙ ЗАЩИТЫ ОТ ЛИПОТОКСИЧНОСТИ И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА <i>Парнова Р.Г., Фок Е.М., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А.</i>	491
ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ АФК В РЕДОКС-БАЛАНС КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНОВ СИНУКЛЕИНОВ <i>Серёгина Е.С., Винокуров А.Ю., Чапров К.Д., Абрамов А.Ю.</i>	496
АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ С-МУС ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ <i>Хайтин А.М., Бачурин С.С., Демьяненко С.В.</i>	502
 <b>ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ</b>	
ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА МА-[D-Leu4]-ОВ3 НА ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС <i>Бахтюков А.А., Лебедев И.А., Кузнецова В.С., Фокина Е.А., Деркач К.В., Шпаков А.О.</i>	506
БЕНЗИМИДАЗОЛ-КАРБОКСАМИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ХОЛИНЭСТЕРАЗАМИ И СЕРОТОНИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПО ДАНЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ <i>Белинская Д.А., Челуснова Ю.В., Воронина П.А., Гончаров Н.В.</i>	512
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С РЕЦЕПТОРОМ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА ПО ДАНЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ <i>Белинская Д.А., Гончаров Н.В.</i>	517
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ И ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АЛЬФА- АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЕЙСМЕКЕРНОЙ ФУНКЦИИ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА <i>Воронина Я.А., Кузьмин В.С.</i>	523
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА <i>Долгачева Л.П., Челуснова Ю.В., Белинская Д.А., Зинченко В.П., Гончаров Н.В.</i>	528
АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА <i>Иванова В.П.</i>	533

- ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АСТРОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ  
*Иванов О.А., Горбачева Л.Р., Колмогоров В.С.* 537
- ВЛИЯНИЕ ПОПЕРЕЧНОСШИТЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ  
*Ивановская Е.В., Болдова А.Е., Сидорина А.Н., Ивановская Ю.А., Газитаева З.И., Свешиņикова А.Н.* 542
- ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДОФАМИНА С ИОННЫМИ КАНАЛАМИ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК *CHARA CORALLINA*  
*Катаев А.А.* 545
- СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ МЕТФОРМИНА И АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА У САМЦОВ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, ВЫЗВАННЫМ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ  
*Лебедев И.А., Деркач К.В., Бахтѳюков А.А., Фокина Е.А., Шпаков А.О.* 553
- ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС  
*Новожилѳов А.В., Хабиб С., Ганем А., Воронина П.А., Корф Е.А., Гончарѳов Н.В.* 558
- ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА БАЛАНС МЕТАБОЛИТОВ NO, ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛЯ В БРѳУШНОЙ ПОЛОСТИ КРЫСЫ  
*Поцелуева М.М.* 563
- ГИПООСМОТИЧЕСКАЯ СТРИКЦИЯ СЕГМЕНТОВ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ: РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА  
*Смаглий Л.В., Гусакова В.С., Гусакова С.В., Калинина А.А., Голованѳов Е.А., Гуцин Е.И.* 568
- ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КЛЕТКАХ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР  
*Смекалова А.А., Митѳяшѳова О.С., Монтѳвила Е.К., Алейникова О.В., Лебедева И.Ю.* 571
- ЭНДОКРИННОЕ И ПАРАКРИННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ ИЗ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ  
*Смекалова А.А., Митѳяшѳова О.С., Алейникова О.В., Монтѳвила Е.К., Лебедева И.Ю.* 576



ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ ИММУНОЦИТАМИ КРОВИ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ <i>IN VITRO</i> (НА ПРИМЕРЕ ВАКЦИННОГО АНТИГЕНА SARS-CoV-2) <i>Старкова К.Г., Долгих О.В., Аликина И.Н., Казакова О.А., Алексеев В.Б., Никоношина Н.А.</i>	580
СУКЦИНАТ/SUCNR1 СИГНАЛИЗАЦИЯ ОГРАНИЧИВАЕТ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА СТАРЫХ КРЫС <i>Терехина О.Л., Кирова Ю.И.</i>	584
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ КРЫС НА МОДЕЛИ 6-ОНДА-ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА <i>Успенко Н.И., Мосенцов А.А., Хмиль Н.В., Белослудцева Н.В., Хундерякова Н.В., Медведева В.П., Мальков А.Е., Кичигина В.Ф., Миронова Г.Д.</i>	590
НАРУШЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ С МУТАЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА <i>Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В.</i>	595
ВЛИЯНИЕ ЗАКИСЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ В ТОКСИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА <i>Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В.</i>	600
ДЕЙСТВИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ СЕВЕРНОЙ НАВАГИ <i>Филатова Т.С., Гуськова В.О., Абрамочкин Д.В.</i>	608
ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА, ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО АГОНИСТА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ <i>Фокина Е.А., Деркач К.В., Морина И.В., Бахтоков А.А., Баюнова Л.В., Лебедев И.А., Романова И.В., Шпаков А.О.</i>	613
АНАЛИЗ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ УКАЗЫВАЕТ НА КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ ПЕРИЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВАЗОКОНСТРИКЦИИ <i>Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.</i>	618
МОДУЛЯЦИЯ ТОЛФЕНАМОВОЙ КИСЛОТЫ ГАМК-АКТИВИРУЕМЫХ ТОКОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА <i>Шаронова И.Н., Дворжак А.Ю.</i>	622

## **СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И У ПРОКАРИОТ**

- СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА  
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ  
БЛОКИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ  
*Будаговская Н.В.* 629
- ГИГАНТСКИЙ БЕЛОК ГИГАНТСКИХ Т4-РОДСТВЕННЫХ  
БАКТЕРИОВИРУСОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТРАНСДУКЦИОННЫХ  
ПЕРЕНОСЧИКОВ ОПЕРОНОВ, СОДЕРЖИТ  
Ca<sup>2+</sup>-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН КАЛЕКСЦИТИНА  
*Булавина М.К., Лу Иньхуа, Зимин А.А.* 632
- СТИГМАСТЕРИН – СТРЕССОВЫЙ СТЕРИН  
РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ  
*Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Бабаев В.М., Уваева В.Л.,  
Ренкова А.Г., Галеева Е.И., Рахматуллина Д.Ф., Минибаева Ф.В.* 636
- РОЛЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ  
ПОГЛОЩЕНИЯ КВАНТОВ СВЕТА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИМ  
АППАРАТОМ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ  
*Ветошкина Д.В., Балашов Н.В., Борисова-Мубаракшина М.М.* 645
- ОСНОВНЫЕ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ СИГНАЛИНГА  
АУКСИНА И ИХ РАЗЛИЧИЯ У МОНО-, ДИ- И  
ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВАРИАНТОВ КАРТОФЕЛЯ  
*Ломин С.Н., Колачевская О.О., Архипов Д.А., Романов Г.А.* 647
- ТКАНЕВАЯ И ОРГАНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЦИТОКИНИНОВЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ КАРТОФЕЛЯ. ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ НА  
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕНСОРНЫХ ГИСТИДИНКИНАЗ  
*Мякушина Ю.А., Колачевская О.О., Гетман И.А.,  
Синькевич И.А., Архипов Д.В., Бравкова Е.В., Романов Г.А.* 652
- ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ –  
СЕНСОРА НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ (БИОМЕДИАТОРОВ)  
*Рощина В.В., Яшин В.А., Куньев А.Р., Фатерыга В.В.,  
Солтани Г.А., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М.* 657
- ПРОИЗВОДНЫЕ №6-БЕНЗИЛАДЕНИНА С АНТИЦИТОКИНИНОВЫМ  
ДЕЙСТВИЕМ СТИМУЛИРУЮТ РОСТ КОРНЕЙ  
У ПРОРОСТКОВ АРАБИДОПСИСА  
*Савельева Е.М., Ословский Е.М., Романов Г.А.* 662

## **ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИЗАЦИИ В СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ**

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА СВБР1 СВЯЗАНА С УРОВНЕМ  
РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ  
КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ  
*Еникеев А.Д., Комельков А.В., Беляева А.А., Галецкий С.А., Чевкина Е.М.* 668

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ  
 $\alpha$ 1А-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ  
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СЕНСИТИЗАЦИИ  
*Исмаилова Д.Х., Мазалов В.В., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.* 675

ЛИГАНДЫ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ  
ИЗМЕНЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ И ПОДВИЖНОСТЬ  
КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА  
*Мазур Д.В., Гондаренко Е.А., Кудряцев Д.С., Антипова Н.В.* 680

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ  
МАТРИКСАХ С РАЗНЫМИ СТРУКТУРНО-  
МЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ  
*Поспелов А.Д., Гефтер С.Д., Карпушин М.Ю., Соколов А.А.,  
Трушина Д.Б., Ефремов М.Ю., Здобнова Т.А., Балалаева И.В.* 684

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ  
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
*Тюрин-Кузьмин П.А., Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю.,  
Калинина Н.И., Ткачук В.А.* 689

## **НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

ДЕЙСТВИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СИНТЕЗА СЕРОТОНИНА  
5-ОКСИТРИПТОФАНА НА ФОРМИРОВАНИЕ УСЛОВНОГО  
ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ  
*Арсланов А.И., Силантьева Д.И., Андрианов В.В.,  
Дерябина И.Б., Гайнутдинов Х.Л.* 694

НЕЙРОННЫЕ СЕТИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АДИПОГЕНЕЗА  
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ  
*Волошин Н.С., Чечехина Е.С., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю.* 696

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ОЦЕНКИ ЭСТЕРАЗНОГО  
СТАТУСА ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС  
*Воронина П.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В.* 703

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ ПОМОЩИ ТОПОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ <i>Крицкая К.А., Бережнов А.В., Федотова Е.И., Ларюшкин Д.П.</i>	709
ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ МОЩНОСТЬ И ПОТЕНЦИАЛ: ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРИНЦИПЫ <i>Надеев А.Д., Гончаров Н.В.</i>	713
ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОГО АЛГОРИТМА РАСЧЕТА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НА ПРИМЕРЕ ДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ ТОКСИКАНТОВ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ VERO SCL-81 И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ <i>Надеев А.Д., Трулев А.С., Рубинштейн А.А., Кудрявцев И.В., Гончаров Н.В.</i>	717
МЕХАНИЗМЫ ОСТРОГО ПОЧЕЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В НОВОЙ МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ <i>Плотников Е.Ю., Брезгунова А.А., Андрианова Н.В., Попков В.А., Ткачев С.Ю., Манских В.Н., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Тимашев П.С., Силачев Д.Н., Зоров Д.Б.</i>	720
НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ БАЛАНСЕ ЦИТОПЛАЗМЫ <i>Погорелов А.Г., Панаит А.И., Станкевич А.А., Погорелова В.Н.</i>	725
АЛГОРИТМ ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПОСЛЕ ВЫЗВАННОЙ ИШЕМИИ ПОСРЕДСТВОМ ОКРАСКИ ТТС <i>Сариев А.У., Баев А.Ю.</i>	732
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 2-(ХЛОРДИНИТРОМЕТИЛ)-4- МЕТОКСИ-6-(4-МЕТИЛПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-1,3,5-ТРИАЗИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА <i>Сизова А.И., Ильясов П.В., Богуш В.В., Лимарева Л.В.</i>	734
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ СКОРОСТИ АТФ-ПОТРЕБЛЯЮЩИХ РЕАКЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА АТЕАМ <i>Третьяков Д.О., Лапашина А.С., Фенюк Б.А.</i>	739
ПРИМЕНЕНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ <i>Чечехина Е.С., Волошин Н.С., Тюрин-Кузьмин П.А.</i>	746
<b>АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ</b>	754
<b>НАШИ ПАРТНЕРЫ</b>	761

## ОБЩИЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ

### РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В АКТИВАЦИИ В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТОВ

*Болдова А.Е.<sup>1</sup>, Хамитов Д.Р., Григорова И.Л.<sup>2</sup>, Свешникова А.Н.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт трансляционной медицины

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. Д. Рогачева,  
Москва, Россия

**Введение.** Иммунный ответ организма является сложным и многоуровневым процессом, в котором участвуют различные клетки и молекулы. Одним из ключевых элементов адаптивного иммунного ответа являются В-клетки, способные продуцировать антитела, специфичные для разных антигенов. Активация В-лимфоцитов инициируется в первую очередь посредством активации специфических В-клеточных рецепторов (BCR). BCR состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, способных узнавать антиген, а также из двух молекул Ig $\alpha$  и Ig $\beta$ , передающих сигнал внутрь клетки. На сегодняшний день существует довольно много гипотез о механизме активации BCR [1]. Так, в рамках одной из гипотез предполагается, что в покое рецепторы представлены преимущественно в виде мономеров. При связывании с мультвалентным антигеном мономеры «стягиваются», образуя олигомеры и запуская каскад сигнальных процессов. Кроме того, в последние годы было обнаружено, что актиновый цитоскелет способен оказывать огромное влияние на процессы активации В-клеток [2].

Целью настоящей работы является построение достоверной компьютерной модели, описывающей поведение отдельных В-клеточных рецепторов в процессе активации В-клеток.

**Материалы и методы.** Была разработана стохастическая пространственная компьютерная модель, описывающая динамику диффузии, кластеризации и фосфорилирования В-клеточных рецепторов (BCR) на поверхности В-лимфоцитов. В качестве объекта исследования был выбран BCR типа IgM. Для моделирования был выбран регион плазматической мембраны В-лимфоцита размерами 1.25×1.25 мкм<sup>2</sup> (что соответствует примерно 0.8% от всей поверхности типичного В-лимфоцита [3]).

Коэффициенты диффузии BCR при различных плотностях актинового цитоскелета, распределения размеров липидных рафтов

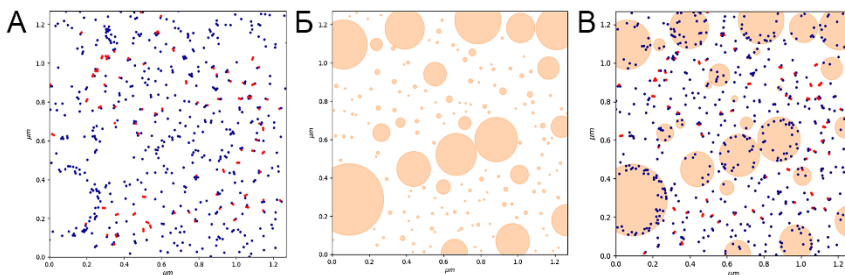
рецепторов были получены из литературы. Неизвестные параметры были подобраны на основе доступных экспериментальных данных.

Было сделано предположение, что движение отдельных BCR может быть рассмотрено как броуновское и, соответственно, может быть описано с помощью формулы Эйнштейна-Смолуховского. Так, смещение отдельной частицы  $r$  в двумерном пространстве описывается следующими уравнением:

$$r = \sqrt{4 \times D \times \Delta t}, \quad (1)$$

где  $D$  – коэффициент диффузии,  $\Delta t$  – шаг времени.

Модель была разработана в языке программирования Python, с использованием стандартных общедоступных библиотек `pumpy`, `scipy`, `pandas`. Расчёт нового положения рецепторов производился итеративно на основании данных о их положении в предыдущий момент времени.

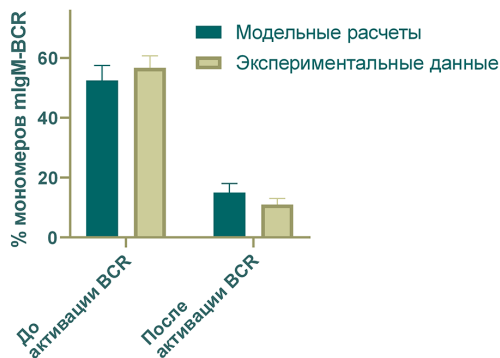


**Рис. 1.** Типичное представление участка мембраны В-клеток, предсказанное с помощью построенной модели. А. Расположение отдельных BCR. Синим обозначены неактивированные молекулы, красным – активированные. Б. Расположение липидных рафтов на участке мембраны. В. Объединенное изображение, включающее, как В-клеточные рецепторы, так и липидные рафты.

**Результаты и выводы.** Каждый из BCR моделировался как круглый объект радиусом  $5\mu$ , что соответствует линейным размерам типичного IgM. Рецепторы в модели находятся либо в нефосфорилированном (синий на рис. 1А) или в фосфорилированном (красный на рис. 1А) состоянии. Фосфорилирование рецепторов происходило при их димеризации: с BCR-рецепторами ассоциированы тирозинкиназы *Lyn*, проводящие кросс-фосфорилирование аминокислотных остатков тирозина в цитоплазматической последовательности BCR, также известной как ITAM. Дефосфорилирование рецепторов проводилось CD45 фосфатазами, которые являются конституционно активными. Было показано, что CD45 обычно располагаются на периферии липидных рафтов и, таким образом,

при кластеризации BCR, рецепторы, находящиеся в центре кластеров и далеко от границ липидных рафтов, оказываются «защищены» от дефосфорилирования.

В основе модели лежит предположение, что каждый из BCR находится в липидном рафте [4], а при активации и последующей кластеризации рецепторов, происходит «слияние» липидных рафтов. Липидные рафты рассматривались как круглые объекты, радиус которых определялся случайным образом на основе нормального распределения их размеров в покоящихся В-лимфоцитах – от 2 до 100 нм [5]. В модель дополнительно были введены «пустые» липидные рафты, не содержащие рецепторов (рис. 1Б), так как небольших липидных рафтов, с которыми ассоциированы BCR было бы недостаточно для покрытия всей площади клетки. Общая площадь, занимаемая липидными рафтами, составляла 30% от поверхности клеточной мембраны, что согласуется с данными микроскопии. Липидные рафты также могли двигаться в мембране, причем коэффициент диффузии отдельных рафтов зависел от величины рафта и был обратно пропорционален логарифму радиуса. При пересечении нескольких рафтов происходило их слияние.



**Рис. 2.** Сопоставление предсказаний модели и экспериментальных данных. На диаграмме представлена доля мономеров BCR наивных В-лимфоцитов и активированных. Желтым обозначены экспериментальные данные, зеленым – полученные в результате работы модели.

Важной особенностью разработанной модели является возможность учёта различной плотности актинового цитоскелета в различных субмембранных доменах клетки. Ранее в литературе было показано, что перестроения актинового цитоскелета значимым образом влияют на динамику кластеризации мембранных рецепторов. В рамках построенной модели актиновый цитоскелет не выражается явным образом. Влияние данной структуры на результат работы модели задается через ограничения, накладываемые на коэффициент диффузии рецепторов

в различных регионах. Так, в нейтральном состоянии коэффициент диффузии BCR в соответствии с литературными данными составляет  $0.014 \text{ мкм}^2/\text{с}$  [6]. При активации BCR происходит образование сигнасомы с привлечением большого числа ферментов (таких как фосфолипаз и фосфоинозитид-3-киназ) в область активированного рецептора. В результате локальный состав мембраны около данного рецептора изменяется. Все изменения приводят к уменьшению локальной плотности цитоскелета и увеличению коэффициента диффузии BCR и липидных рафтов, соответственно. Построенная модель согласуется с известными экспериментальными данными, описывающими долю В-клеточных рецепторов, находящихся в мономерном состоянии как у наивных, так и активированных клеток (рис. 2) [7].

Таким образом, была впервые построена стохастическая модель подобного типа, описывающая движение и активацию BCR. Данная модель учитывает не только микродоменную структуру плазматической мембраны В-лимфоцитов, но и актиновый цитоскелет, перестройка которого могут значительным образом влиять на динамику кластеризации мембранных рецепторов.

Работа поддержана грантом РФФ 23-44-00082.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Feng Y., Wang Y., Zhang S. et al.* // Journal of Genetics and Genomics 2020. 47: 27-35.
2. *Li J., Yin W., Jing Y. et al.* // Front. Immunol. 2019. 9: 3096.
3. *Cano R.L.E., Lopera H.D.E.* // In: *Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A. et al.*, eds. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. 2013. Chapter 5.
4. *Stone M.B., Shelby S.A., Núñez M.F. et al.* // eLife. 2017. 6: e19891.
5. *Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. 18: 361-74.
6. *Treanor B., Depoil D., Gonzalez-Granja A. et al.* // Immunity. 2010. 32: 187-99.
7. *Gomes de Castro M.A., Wildhagen H., Sograte-Idrissi S. et al.* // Nature Communications 2019. 10: 820.



# ДЕЛЕЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SATB1 ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ ПРОТЕИНАЗ В КЛЕТКАХ КОРЫ МОЗГА И КОРРЕЛИРУЕТ С ГИПЕРВОЗБУЖДЕНИЕМ НЕЙРОНАЛЬНЫЙ СЕТИ

*Варламова Е.Г.<sup>1</sup>, Рогачев В.В.<sup>1</sup>, Тарабыкин В.С.<sup>2,3</sup>,  
Бабаев А.А.<sup>2</sup>, Туровский Е.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия

<sup>2</sup>Нижегородский государственный университет имени Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup>Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский Университет Шарите, Берлин, Германия

**Введение.** Кора головного мозга является главным достижением эволюции млекопитающих и представляет собой центр высшего познавательного потенциала, который отличает человека от других видов животных [1]. Развитие коры головного мозга сложный и высокоорганизованный процесс. Нарушение любого из перекрывающихся шагов, которые вносят вклад в этот процесс, может привести к целому ряду нарушений развития. Многие из этих расстройств относятся к порокам развития коры головного мозга [2]. Пороки развития коры головного мозга в настоящее время чаще исследуются в качестве причины эпилепсии, задержки в развитии, неврологического дефицита и умственной отсталости у человека. В последние два десятилетия значительный прогресс достигнут в определении генов, которые контролируют различные аспекты развития коры мозга [3]. Однако многие из этих генов и факторов транскрипции малоизвестны относительно других сигнальных молекул, которые также контролируют развитие головного мозга.

Транскрипционный фактор Satb1 (special AT-rich sequence-binding proteins 1) вовлечен в организацию хроматина, регуляцию дифференцировки стволовых клеток, нейронов и остеобластов. В коре мозга из известных на настоящий момент функций Satb1 следует выделить регуляцию миграции и созревания соматостатин-положительных интернейронов, участие в синаптогенезе и дифференцировке нейронов [4]. Satb1 широко представлен в мозге в неокортексе, ядре диагонального пучка, миндалевидном теле, гиппокампе и спинном мозге. В тоже время Satb1-позитивные нейроны в очень небольшом количестве обнаруживаются в черной субстанции среднего мозга и преимущественно в дофаминергических нейронах. Различный уровень экспрессии Satb1

показан и в разных подтипах нейронов. Так, высокий уровень экспрессии *Satb1* установлен для SST<sup>-</sup>, CR<sup>+</sup> и NPY<sup>+</sup>-интернейронов, а в VIP<sup>+</sup>-интернейронах экспрессии *Satb1* не выявлено [4,5]. *Satb1* регулирует экспрессию целого ряда генов в коре мозга – *ERRB2*, *ABL1*, *MMP2*, *E-CADHERIN*, *VEGFB*, *TGFB1* и *KISS1* [6], а также гены, кодирующие субъединицы возбуждающий рецепторов глутамата [7].

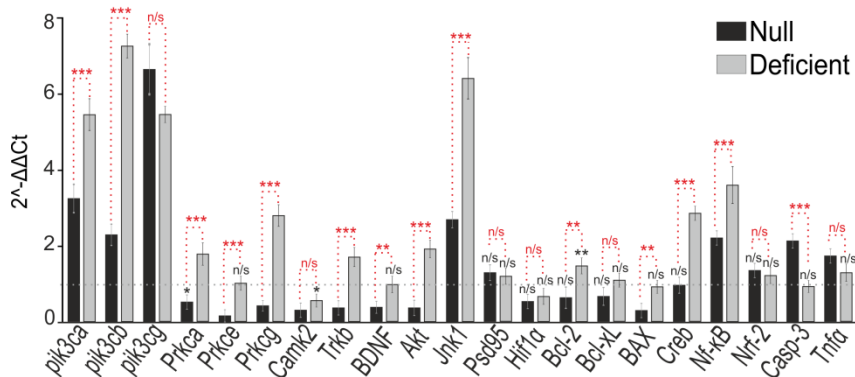
Некоторое количество мышей с мутацией *Satb1* характеризуется неполным открыванием глаз и повышенным хватательным рефлексом [8]. У мышей с полной делецией *Satb1* развитие коры мозга происходит без существенных нарушений, но для пирамидальных нейронов в постнатальный период показано снижение плотности дендритных шипиков, играющих ключевую роль в синаптической трансмиссии и пластичности. Кроме того, транскрипционный фактор *Satb1* регулирует ряд генов раннего развития – *Fos*, *Fosb*, *Egr1*, *Egr2*, *Arc*, *Bdnf* и др., вовлеченных также в синаптическую пластичность [9].

Целью данного исследования стало исследование роли транскрипционного фактора *Satb1* в регуляции экспрессии ключевых протеинкиназ, гипервозбуждении нейронов коры мозга и активации феномена гипоксического прекодиционирования.

**Материалы и методы.** Колонии мышей с делецией транскрипционного фактора *Satb1* были получены из SPF вивария Нижегородского государственного университета им. Лобачевского. Эксперименты проводили на клеточных культурах коры мозга, полученных из новорожденных мышей, которые культивировали до 10-14 дня *in vitro*. Эксперименты по регистрации уровня цитозольного кальция в клетках ( $[Ca^{2+}]_i$ ), нагруженных флуоресцентным кальциевым зондом Fura-2, проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M. Моделирование условий гипоксии/реоксигенации производилось в соответствии с описанной ранее методикой [10]. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора реагентов Mag Jet RNA (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 5 мкл qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия), 1 мкл (0.2 мкмоль) каждого праймера, 17 мкл воды, 1 мкл кДНК. Амплификацию проводили в 48-луночном амплификаторе D-lite5 (ДНК-Технология, Россия). Экспрессию генов нормировали по контрольному гену *GAPDH*, кодирующему глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Результаты рассчитывали в соответствии со стандартным методом.

**Результаты. Делеция транскрипционного фактора *Satb1* в нейронах коры мозга приводит к нарушению экспрессии ключевых протеинкиназ и генов-регуляторов жизнеспособности клеток.** В клетках коры мозга из *Satb1*-deficient мышей (неполная делеция)

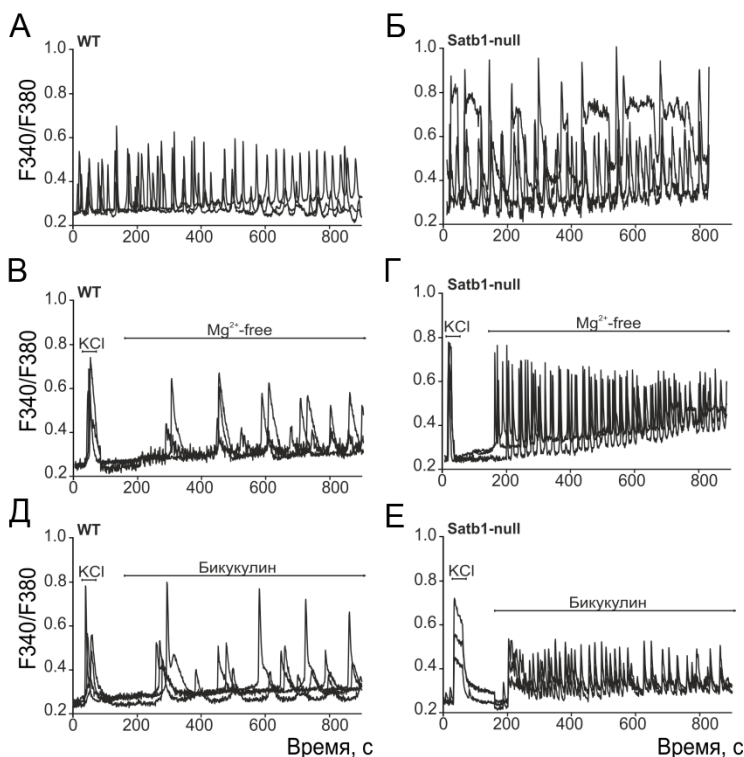
происходило увеличение экспрессии генов, кодирующих изоформы протеинкиназ PI3K (*pik3ca*, *pik3cb*, *pik3cg*) в 5-7 раз, PKC (*Prkca*, *Prkcg*) в 2-3.5 раза, Akt в 2 раза, Jnk1 в 6.5 раз, по сравнению с клетками из мышей дикого типа. При этом в *Satb1*-deficient клетках происходило снижение экспрессии генов, кодирующих CaMKII (*Camk2*) (рис. 1 – серые столбцы). Тогда как в клетках *Satb1*-null мышей (полная делеция *Satb1*), происходило снижение экспрессии генов, кодирующих PKC, более выраженное снижение CaMKII, Akt, но экспрессия PI3K и Jnk1 была выше, по сравнению с диким типом (рис. 1 – черные столбцы). Экспрессия генов, кодирующих факторы транскрипции и белки-регуляторы апоптоза также по-разному определяется делецией *Satb1*. В клетках *Satb1*-deficient мышей увеличивалась экспрессия *Trkb*, *Bcl-2*, *Creb*, *Nf-kB* (рис. 1 – серые столбцы), тогда как в клетках *Satb1*-null экспрессия *Trkb*, *BAX* – снижалась, а уровень *Nf-kB*, *Casp-3* и *Tnfa* – повышался (рис. 1 – черные столбцы).



**Рис. 1.** Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих протеинкиназы, транскрипционные факторы и белки-регуляторы апоптоза в клетках коры мозга, полученных из *Satb1*-null (Null) и *Satb1*-deficient (Deficient) мышей. Уровень экспрессии мРНК в клетках коры контрольных мышей (WT) приняты за 1 и представлен в виде пунктирной линии. мРНК получали из первичных клеточных культур коры мозга мышей после 10 дней культивирования.

Таким образом, полная и неполная делеция транскрипционного фактора *Satb1* по-разному влияла на экспрессию протеинкиназ и генов-регуляторов жизнеспособности клеток. Дефицит *Satb1* в целом, приводил к компенсаторному повышению экспрессии большинства исследованных протеинкиназ, а полная делеция *Satb1*, наоборот, вызывала снижение их экспрессии и тренд к повышению уровня экспрессии генов, кодирующих проапоптотические белки.

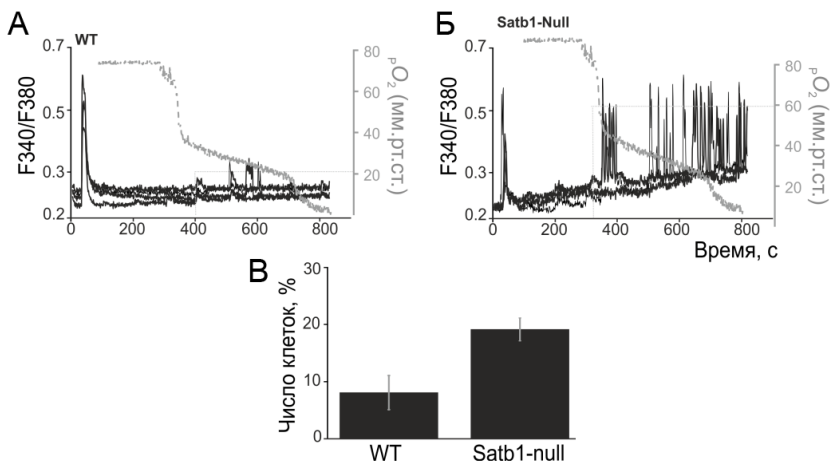
**Делеция транскрипционного фактора *Satb1* коррелирует с повышенным гипервозбуждением нейронов коры мозга.** Анализ спонтанной  $\text{Ca}^{2+}$ -активности нейронов коры мозга мышей дикого типа (WT) и *Satb1*-null нейронов показал, что на 14 день культивирования в WT- и *Satb1*-null нейронах регистрировалась спонтанная  $\text{Ca}^{2+}$ -активность. Частота спонтанных  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций в обеих экспериментальных группах достоверно не отличалась, но амплитуда  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсов была выше в *Satb1*-null нейронах (рис. 2Б), по сравнению с WT-нейронами (рис. 2А).



**Рис. 2.** Генерация спонтанных (А, Б), индуцированных безмагниевой средой ( $\text{Mg}^{2+}$ -free) (В, Г) и вызываемых аппликацией бикикулина (Д, Е)  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций в клетках коры мозга, полученных из контрольных (WT) и *Satb1*-null мышей.

На 10 день культивирования в нейронах еще не регистрировалось генерации спонтанной  $\text{Ca}^{2+}$ -активности (рис. 2В-Е). Моделирование эпилептиформной активности нейронов с помощью замены среды на безмагниевою или добавления 10 мкМ бикикулина показало, что в WT- (рис. 2В, Д) и *Satb1*-null нейронах (рис. 2Г, Е) происходила генерация  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций. При этом в безмагниевой модели эпилептиформной

активности амплитуда и частота  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляций была ниже в WT-нейронах (рис. 2В), по сравнению с *Satb1*-null нейронами (рис. 2Г). При добавлении бикикулина к *Satb1*-null нейронам коры мозга происходили высокочастотные  $\text{Ca}^{2+}$ -осцилляции с высокой степенью синхронизации (рис. 2Е), тогда как в WT-нейронах  $\text{Ca}^{2+}$ -колебания были несинхронными и низкочастотными, но с высокими амплитудами (рис. 2Д).



**Рис. 3.** Действие гипоксии на контрольные (WT) и *Satb1*-null нейроны коры мозга. А, Б – Снижение парциального давления кислорода ( $\text{pO}_2$ ) в экстраклеточной среде вызывает увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в культивируемых нейронах коры мозга, полученных из мышей дикого типа (А, WT) и *Satb1*-null мышей (Б). В – число нейронов (выраженное в процентах от общего числа в поле зрения микроскопа), реагирующих повышением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время моделирования гипоксии. Для выявления нейронов производили кратковременную деполяризацию с помощью 35 мМ KCl. Для наглядности  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы нейронов построены в одинаковых шкалах по оси Y. В виде серых осей Y и кривой на графике (справа) показано уменьшение парциального давления кислорода ( $\text{pO}_2$ , мм рт. ст.) в ячейке с клетками во время эксперимента, измеренное с помощью соматического оксиметра.

**Делеция транскрипционного фактора *Satb1* влияет на чувствительность нейронов коры мозга к гипоксии.** Нейроны от астроцитов отличали с помощью деполяризующего стимула в виде кратковременной аппликации 35 мМ KCl, на который реагируют увеличением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  исключительно нейроны. Далее с помощью разработанной нами вакуумной системы создавали условия гипоксии, вытесняя растворенный в экспериментальной камере кислород. Одновременно с регистрацией  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , производилось измерение

парциального давления кислорода ( $pO_2$ ) с помощью соматического оксиметра. Пороговым значением уменьшения  $pO_2$  считали начало генерации  $Ca^{2+}$ -ответов в нейронах. Появление первых  $Ca^{2+}$ -ответов на гипоксию в WT-нейронах происходило в 8-10% клеток (рис. 3А, В), когда парциальное давление кислорода снижалось до 40 мм рт. ст., при этом остальные клетки в поле зрения микроскопа не реагировали. Satb1-null нейроны начинали реагировать на гипоксию при 60 мм рт. ст., причем  $Ca^{2+}$ -ответы имели вид высокоамплитудных  $Ca^{2+}$ -осцилляций (рис. 3Б), регистрируемых в более чем 15% клеток (рис. 3В). При этом Satb1-null нейроны реагировали появлением высокочастотных  $Ca^{2+}$ -осцилляций с выходом базового уровня  $[Ca^{2+}]_i$ ; на новый стационарный уровень уже при снижении  $pO_2$  до 75-80 мм рт. ст., а с учетом высокого процента (более 20%) отвечающих нейронов, можно говорить о повышенной чувствительности Satb1-null нейронов к гипоксии.

**Обсуждение.** Спонтанная активность нейронов во время развития ЦНС влияет на такие процессы развития, как миграция клеток, синаптогенез и созревание нейронов [11]. Установлено, что экспрессия Satb1 слабо выражена через 24 часа после посева в ГАМКергических нейронах, выделенных из заднего мозга эмбрионов мышей, но процент Satb1<sup>+</sup>-ГАМКергических нейронов увеличивается в процессе культивирования. При этом деполяризующий стимул с помощью аппликации 40 мМ KCl к этим культурам приводит к повышению  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах через потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа [12] и сопровождается существенным нарастанием уровня экспрессии Satb1. В нашем случае, делеция Satb1 в корковых нейронах приводила к более выраженным спонтанным  $Ca^{2+}$ -осцилляциям, а также к большей «склонности» нейрональной сети к индукции эпилептиформной активности. Что также может подтверждаться данными о селективной делеции Satb1 в ингибиторных интернейронах, которая приводила к повреждению механизмов ингибирования пирамидных нейронов, что на уровне *in vivo* проявлялось в индукции эпилептиформной активности в кортикальных слоях мозга [13]. Также известно, что полная делеция Satb1 в SST<sup>+</sup>-интернейронах приводила к аномальной интеграции этих интернейронов в процессе развития сетей, что может служить причиной их повреждению и гибели [14]. Схожим образом, в наших экспериментах, полная делеция Satb1 коррелировала со снижением экспрессии генов, кодирующих ключевые протеинкиназы, ответственные за выживаемость клеток и совпадала с повышением экспрессии провоспалительных генов. Что касается чувствительности к гипоксии, то известны наиболее чувствительные к гипоксии популяции ГАМКергических нейронов [10]. Поскольку, как указано выше, экспрессия Satb1 снижена в ГАМКергических нейронах [12], то полная делеция Satb1 в пирамидных нейронах коры мозга, в нашем случае, может менять фенотип

глутаматергических нейронов и повышать их чувствительность к гипоксии.

Таким образом, наши данные говорят в пользу того, что делеция транскрипционного фактора *Satb1*, определяющего пороки развития коры мозга, тесно связана с гипоксическими явлениями и определяет повышенную чувствительность *Satb1*-null нейронов к снижению концентрации кислорода в кровотоке.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-24-00712

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hill R.S., Walsh C.A. // *Nature*. 2005. 437: 64-7
2. Guerrini R., Dobyns W.B. // *Lancet Neurol*. 2014. 13: 710-26
3. Lodato S., Shetty A.S., Arlotta P. // *Trends Neurosci*. 2015. 38: 117-25.
4. Denaxa M., Kalaitzidou M., Garefalaki A. et al. // *Cell Rep*. 2012. 2: 1351-62.
5. Fogarty M., Grist M., Gelman D. et al. // *J. Neurosci*. 2007. 27: 10935-46.
6. Mir R., Pradhan S.J., Galande S. // *Curr. Drug Targets*. 2012. 13: 1603-15.
7. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Fedotova E.I. et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. 22: 5968.
8. Alvarez J.D., Yasui D.H., Niida H. et al. // *Genes Dev*. 2000. 14: 521-35.
9. Balamotis M.A., Tamberg N., Woo Y.J. et al. // *Mol. Cell. Biol*. 2012. 32:333-47.
10. Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Vedunova M.V. et al. // *Neurosci. Bull*. 2020. 36: 733-60.
11. Moody W.J., Bosma M.M. // *Physiol. Rev*. 2005. 85: 883-941.
12. Jiang M., Swann J. // *Neurosci*. 2005. 135: 839-50.
13. Batista-Brito R., Rossignol E., Hjerling-Leffler J. et al. // *Neuron*. 2009. 63: 466-81.
14. Close J., Xu H., De Marco Garcia N et al. // *J. Neurosci*. 2012. 32: 17690-705.

## ФУНКЦИИ КАТИОНА НИТРОЗОНИЯ NO<sup>+</sup> В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

*Васильева С.В.*

Институт биохимической физики РАН, Москва, Россия

**Введение.** Оксид азота – главная сигнальная молекула биосистем [1]. Функции сигналинга NO и его производных RNS связаны с таргетной модификацией протеиновых остатков цистеина S-нитрозированием, S-окислением и нитрованием липидов. NO и его производные индуцируют также оксидативный и нитрозативный стрессы и повреждения в ДНК-нитрозативное дезаминирование оснований нуклеиновых кислот, их транзиции и трансверсии, алкилирование, разрывы ДНК и ингибирование ДНК-репарационных ферментов, процессы, неразрывно связанные с

активацией экспрессии ДНК-репарационных процессов. В *E. coli* это главные системы SoxRS, SOS и др. [2-6].

Генетическая активность NO и его соединений контролируется клеточным железом [5]. В качестве рабочей формы низко стабильной молекулы NO в живых организмах выступают динитрозильные комплексы железа с тиосульфатными лигандами (ДНКЖ) [6,7]. С молекулами пероксинитрита ассоциируется цитотоксическое действие оксидативного стресса.

Механизмы бактерицидного действия NO и его производных были сформулированы после десятков лет широкого использования нитритов для подавления роста гнилостных бактерий *Clostridium botulinum* и *Clostridium sporogenes* и дрожжей при культивировании в хемостате [8-9]. Было показано, что нитрит сам по себе плохой ингибитор роста кластридий: (при pH 7.0 он неэффективный нитрозирующий агент, с очень низкой фракцией азотистой кислоты 0.022%). Однако азотистая кислота, оксид азота и железо-сера-нитрозильные комплексы обладали токсической активностью, поскольку все они могли продуцировать катион нитрозония NO<sup>+</sup>.

Высвобождение (донирование) равного количества NO и NO<sup>+</sup> из наиболее изучаемой структуры доноров NO с тиоловыми лигандами – парамагнитных динитрозильных комплексов железа ДНКЖ [Fe<sup>2+</sup> – (NO) (NO<sup>+</sup>)] определяется диспропорционирования двух молекул NO, которые связаны с катионом двухвалентного железа [10-11].

Особое место среди агентов, вызывающих распад ДНКЖ, занимают производные дитиокарбаматов (R<sub>2</sub>=N–CS<sub>2</sub>) = ДЭТК. При этом образуются стабильные ЭПР активные мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ). ЭПР спектры этих соединений в корне отличны от классических спектров ДНКЖ с тиоловыми лигандами с фактором g = 2.03 [12-13], и их легко идентифицировать.

В связи с выше изложенным, целью нашей работы было использовать ДЭТК в совместной обработке клеток *E. coli* с донорами оксида азота для выявления роли и функций катиона нитрозония в качестве одного из составляющих механизма подавления жизнедеятельности (формирования колоний) у бактерий ДНКЖ, GSNO и нитритами.

**Материалы и методы.** Синтез доноров NO – биядерного динитрозильного комплекса железа Б-ДНКЖ<sub>глю</sub> [Fe<sup>2+</sup> – (NO) (NO<sup>+</sup>)], и S-нитрозоглутатиона (GS-NO) проведен в соответствии с [14].

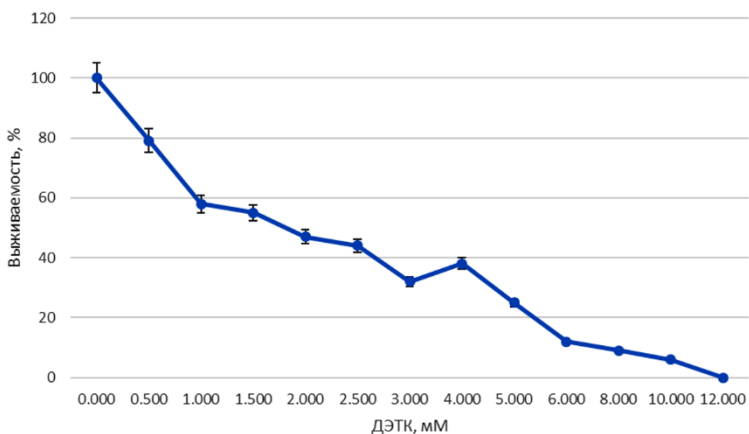
Сульфат железа (Fluka, Buchs, Switzerland), GSH, NaNO<sub>2</sub> и ДЭТК производства Sigma, (St. Louis, USA). Газообразный NO получен реакцией сульфата железа с нитритом натрия в 0.1 М HCl с последующей очисткой при низкой температуре в вакууме (14).



Колониеобразующая активность (КОЭ) бактерий изучена методом серийных разведений на клетках *Escherichia coli* TN530 wt установленного генотипа. [15]. Коротко: восемнадцатичасовую бактериальную суспензию в жидкой среде LB (37°C), разводили 1:50 и подращивали до достижения культурой лог фазы роста (титр  $3-5 \times 10^8$  кл/мл). Обработка клеток и изучение дозовой зависимости КОЭ от активности доноров NO – Б-ДНКЖ-GSH, NaNO<sub>2</sub> и GS-NO, а также ДЭТК проводились как при моно обработке клеток донорами NO и ДЭТК, так и при совместном внесении в суспензию обоих компонентов обработки – одновременном, либо с использованием лаг-периода в 40 минут между внесением донора и последующим внесением ДЭТК. Оптические измерения плотности суспензии проведены на спектрофотометре PD-303 UV (Apel Co LTD, Япония) в кварцевых кюветах при комнатной температуре.

Спектры ЭПР клеток после их обработки ДНКЖ всех вар. измеряли при 77 К (в кварцевых сосудах с жидким азотом) на спектрометре RadioPan (Польша,) при СВЧ мощности 5 мВт и амплитуде ВЧ и модуляции магнитного поля, равной 0.2 мТл. Величину сигнала ЭПР оценивали стандартным методом [15], используя для сравнения эти показатели растворов М-ДНКЖ-GSH известных концентраций [16-18].

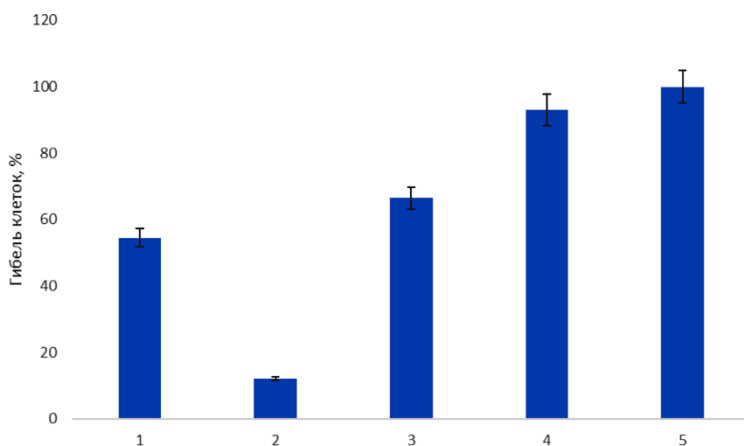
**Статистическая обработка результатов.** Каждый результат оценивался как среднее трех независимых измерений  $\pm$  стандартное отклонение (M $\pm$ SD).



**Рис. 1.** Дозовая зависимость выживаемости (% КОЭ) *E. coli* TN530 от концентрации ДЭТК, мМоль/л. Данные есть средние значения при  $n = 5$ .

**Результаты и обсуждение.** Оценка влияния ДЭТК на показатели КОЭ в *E. coli* с моно- либо комплексной обработкой клеток с ДЭТК была проведена при концентрациях ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH в 2.5 и 0.5 мМ

соответственно. Добавленные к клеткам *E. coli* в отдельности, они вызывали гибель в  $50\pm 5\%$  и  $12\pm 5\%$  клеток, т.е. суммарно  $62\pm 5\%$  клеток (рис. 2). Статистически значимая существенно большая гибель клеток имела место, если ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH добавляли в тех же концентрациях к клеткам одновременно, и затем эти клетки инкубировали 18 часов с последующей оценкой величины погибших клеток – она достигала  $93\pm 5\%$  (рис. 2). Если же ДЭТК добавляли к клеткам через 40 мин инкубации с Б-ДНКЖ-GSH, уровень погибших клеток достигал 100% (рис. 2).

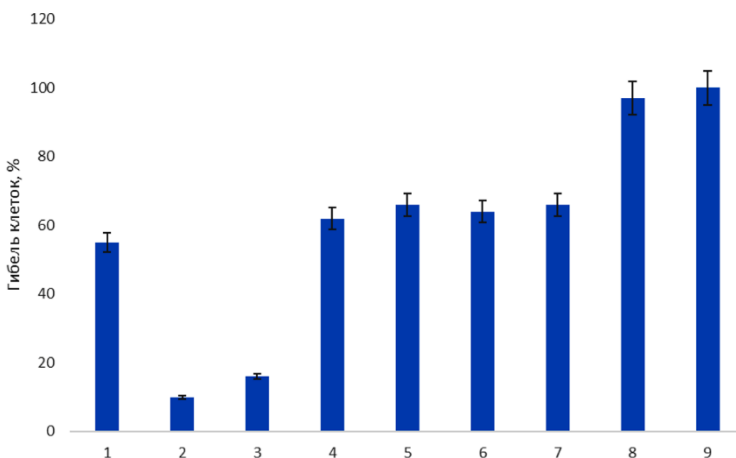


**Рис. 2.** Гибель клеток (% КОЭ) *E. coli* TN530 при различных вариантах обработки. Монообработка: 1 – ДЭТК (2.5 мМ); 2 – Б-ДНКЖглу (0.5 мМ). Сумма эффектов: 3 – 1+2; 4 – Б-ДНКЖглу+ДЭТК (одновременное внесение); 5 – ДЭТК внесен через 40 мин после Б-ДНКЖглу. Данные есть средние значения при  $n = 5$ .

При монообработке клеток Б-ДНКЖ-GSH в них формировался ЭПР сигнал с  $g_{\perp} = 2.04$  и  $g_{\parallel} = 2.014$  ( $g_{\text{ср}} = 2.03$ , характерный для стабильных при комнатной температуре и связанных с белками высокомолекулярных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и регистрируемый при 77 К). При совместной обработке клеток с Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК в клетках регистрировался бесструктурный синглетный сигнал ЭПР, характерный для монокислотных комплексов с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК) в водной среде, очевидно в межклеточной (данные не приводятся).

**Цитотоксическое действие нитрита натрия и S-нитрозоглутатиона на клетки *E. coli*.** Поскольку при обработке бактерий соединениями с анионами нитрита или S-нитрозотиолами RS-NO в этих организмах возникают комплексы ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [10,13,18], есть основания предполагать, что

цитотоксическое действие нитрита натрия и GS-NO также опосредовано образованием в этих клетках ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, а содержащиеся в них катионы нитрозония  $\text{NO}^+$  также могут приводить к цитотоксическому действию  $\text{NaNO}_2$  и GS-NO, а 40-мин интервал усилит эти процессы. Инкубация в течение 18 часов клеток *E. coli* в среде, содержащей 0.5 мМ нитрита натрия или GS-NO, приводила к гибели соответственно  $10 \pm 3\%$  и  $15 \pm 4\%$  % клеток (рис. 3). Если же к этим клеткам, через 40 минут после начала их контакта с нитритом натрия или GS-NO, добавляли 2.5 мМ ДЭТК, то в обоих случаях через 18 часов обнаруживалась практически 100%-ная гибель клеток (рис. 3).



**Рис. 3.** Гибель клеток (% КОЭ) *E. coli* TN530 при различных вариантах обработки. Монообработка: 1 – ДЭТК (2.5 мМ); 2 –  $\text{NaNO}_2$  (0.5 мМ); 3 – GSNO (0.5 мМ). Сумма эффектов: 4 – 1+2; 5 – 1+3; 6 –  $\text{NaNO}_2$ +ДЭТК (одновременное внесение); 7 – GSNO+ДЭТК (одновременное внесение); 8 – ДЭТК внесен через 40 мин после  $\text{NaNO}_2$ ; 9 – ДЭТК внесен через 40 мин после GSNO.

Об образовании М- и Б-ДНКЖ в этих бактериальных клетках свидетельствовала регистрация ЭПР сигнала М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в этих клетках через 40 минут после добавления ДЭТК после нитрита натрия или GS-NO и его трансформация в сигнал ЭПР от МНКЖ-ДЭТК, аналогичному описанному выше сигналу, после добавления к клеткам 2.5 мМ ДЭТК. Интегральная интенсивность этого сигнала в 3-4 раза превышала аналогичную интенсивность исходного сигнала М-ДНКЖ.

**Закключение.** Целью работы был ответ на вопрос- какие составляющие сигнальных молекул биосистем ДНКЖ – нейтральные молекулы NO или катионы нитрозония определяют способность ДНКЖ подавлять жизнедеятельность бактерий. В работе был использован ДЭТК,

который селективно связывается с нейтральной молекулой оксида азота, накапливая таким образом катиона нитрозония, которые вызывают S-нитрозирование разнообразных, жизненно важных белков и приводят клетку к гибели. Именно в этих вариантах была достигнута практически 100% гибель бактериальных клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ignarro L.J.* // J. Physiol. Pharmacol. 2002. 53: 503-14.
2. *Hemish J., Nakaya N., Mittal V. et al.* // J. Biol. Chem. 2003. 278(43): 42321-9.
3. *Storz G., Imlay J.A.* // Curr. Opin. Microbiol. 1999. 2: 188-94.
4. *Nathan C., Shiloh M.U.* // PNAS. 2000. 9(16): 8841-8.
5. *Vasilieva S.V., Moschkovskaya E.Yu., Terekhov A.S. et al.* // Russ. J. Genetics. 2006. 42(7): 737-43.
6. *Hickock J.R., Sahni S., Shen H. et al.* // Free Rad. Biol. Med. 2011. 51: 1558-66.
7. *Vanin A.F.* Dinitrosyl iron complexes as a working form of nitric oxide in living organisms. Cambridge UK. 2019. Cambridge Scholars Publishing.
7. *Cui X., Joannou C.L., Hughes M.N., Cammack R.* // FEMS Microbiology Letters. 1992. 98(1-3): 67-70.
8. *Muray D.B., Engelen F.A.A., Keulers M. et al.* // FEBS Letters. 1998. 431: 297-9.
9. *Borodulin R.R., Kubrina L.N., Poltorakov A.P. et al.* // Nitric oxide Biol. Chem. 2013. 29: 4-16.
10. *Vanin A.F.* // Applied Magnetic Resonance. 2020. 50: 851-76.
11. *Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R.* // Cell Biochemistry and Biophysics. 2021. 79: 93-10.
12. *Ванин А.Ф.* Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: Физико-химия, биология, медицина. Институт компьютерных исследований, М.-Ижевск. 2015.
13. *Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D. et al.* // Nitric oxide Biol. Chem. 2011. 2: 136-49.
14. *Vasilieva S.V., Streltsova D.A., Romanova J.M., Tolordava E.R.* // Fundam Sci Med: Biophys Med Tech 1: МАКС Press, Moscow, 2015. 103-134.
15. *Васильева С.В., Мошкова Е.Ю., Санина Н.А., Алдошин С.М.* // Биохимия. 2004. 69(8): 1088-95.
16. *Vasilieva S.V., Petrishcheva M.S., Gusarova E.I.* // JSM Microbiology. 2017. 5(2): 1039.
17. *Vanin A.F., Vasilieva S.V., Streltsova D.A., Mikoyan V.D.* // Appl. Magn. Reson. 2014. 45: 375-87.

## ПОКАЗАТЕЛИ ЭСТЕРАЗНОГО СТАТУСА КАК БИОМАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ПРОГНОЗА COVID-19

*Воронина П.А., Белинская Д.А., Войтенко Н., Гончаров Н.В.*

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Набор, количество и соотношение активности ферментов из группы эстераз характеризует т.н. «эстеразный статус» организма. Впервые это понятие было предложено группой Г.Ф. Махаевой в 2004 году [1]. Позднее авторы предложили использовать свои представления об эстеразном статусе в качестве комплексного биомаркера воздействия фосфорорганических соединений (ФОС) на организм [2]. Однако, поскольку эстеразы играют важную роль во многих ключевых физиологических процессах в организме, эстеразный статус может отражать и другие функциональные нарушения у людей и животных. Поиск диагностических и прогностических маркеров, оценка риска и вероятности летального исхода многих заболеваний, включая COVID-19, является крайне актуальной задачей. Кровь является не только средой, но и переносчиком биологически активных соединений, субстратов и продуктов метаболизма, и в наибольшей степени отражает негативные изменения, происходящие в организме. Эстеразный статус плазмы крови может претендовать на один из универсальных маркеров различных заболеваний, поэтому заслуживает внимания при поиске маркеров тяжести как COVID-19, так и других патологий инфекционного и неинфекционного характера.

Основные эстеразы плазмы крови человека – это бутирилхолинэстераза (БХЭ, ЕС 3.1.1.8) и параоксоназа-1 (PON1, ЕС 3.1.8.1). Активность именно этих эстераз в норме и при патологии представляет наибольший интерес, поскольку, ввиду своей широкой субстратной активности, они принимают участие во многих жизненно важных процессах. Концентрация других эстераз (карбоксилэстеразы (КЭ), нейротоксической (нейропатической) эстеразы (NTE), димерной эритроцитарной ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и мономерной несплайсированной АХЭ на несколько порядков ниже концентрации БХЭ и PON1 и вносит существенно меньший вклад в эстеразный статус [3]. Более того, NTE и АХЭ эритроцитов являются компонентами не плазмы, а клеточных мембран лимфоцитов и эритроцитов, так что в плазме крови эти ферменты присутствуют главным образом в составе микровезикул [4], концентрация которых непостоянна и в целом невелика с точки зрения вклада этих эстераз в эстеразный статус плазмы, и которые осаждаются при центрифугировании на высоких оборотах.

При анализе эстеразного статуса плазмы крови нельзя игнорировать эстеразную активность сывороточного альбумина. Альбумин – это главный транспортный белок крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500-700 мкМ, является не только пассивным, но и активным участником фармако- или токсикокинетических процессов [5]. При определенных условиях, низкая каталитическая эффективность альбумина компенсируется его высокой концентрацией.

Цель данного исследования – расширить представления об эстеразном статусе плазмы крови и оценить взаимосвязь эстеразного статуса, который включает в себя сведения о количестве и активности сывороточного альбумина, с другими биохимическими показателями крови человека на примере выживших и скончавшихся пациентов с подтвержденным COVID-19.

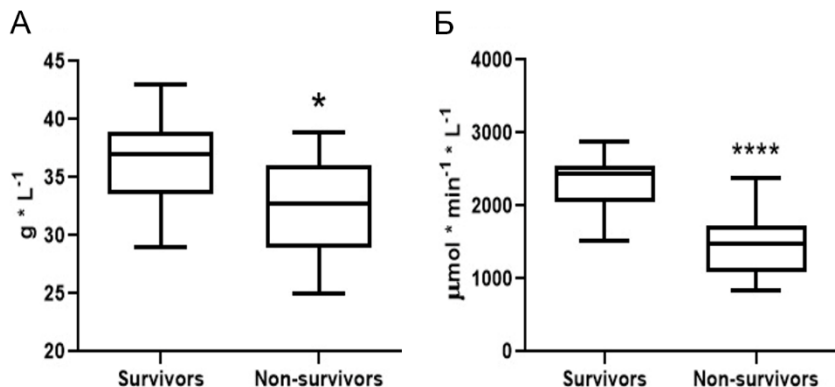
**Результаты и обсуждение.** Мы провели сравнительный анализ эстеразного статуса и ряда основных биохимических показателей плазмы крови здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным COVID-19 при поступлении в стационар, одни из которых выжили, тогда как другие умерли во время пребывания в стационаре (табл. 1).

**Табл. 1.** Биохимические показатели выживших и умерших пациентов с COVID-19. Представлены в виде медиан с разбросом от минимума до максимума (Ме (мин; макс)).

<b>Показатель</b>	<b>Выжили</b>	<b>Умерли</b>
Число образцов, n	19	10
Альбумин (ALB), г/л	37.00 (29.00; 43.00)	32.70 (25.00; 38.90)*
Общий белок (TP), г/л	67.7 (58.8; 82.1)	65.1 (48.9; 82.2)
MDA, мкмоль/л	3.59 (0.74; 7.87)	5.72 (2.12; 8.37)
VChEa, мкмоль/мин*л	1177 (798; 1528)	832 (350; 1535)*
VChEb, мкмоль/мин*л	2435 (1515; 2890)	1471 (850; 2372)****
ALBn, мкмоль/мин*л	48.3 (6.0; 113.3)	43.0 (6.0; 223.5)
PON1, ммоль/мин*л	25.79 (1.28; 48.57)	25.93 (11.82; 32.85)
<b>Индексы</b>		
ALB/TP	0.54 (0.42; 0.66)	0.52 (0.40; 0.58)
UREA*10/ALB	1.29 (0.91; 3.44)	5.40 (1.62; 20.20)****
MDA/ALB	10.98 (2.00; 25.56)	18.78 (7.29; 27.14)*
VChEa/ALB	30.73 (22.61; 46.85)	24.90 (12.38; 39.47)
VChEb//ALB	64.01 (40.94; 89.35)	46.85 (25.51; 60.97)***
Crea* MDA/ALB	11.06 (1.36; 26.25)	19.37 (2.14; 53.08)
UREA* MDA/ALB	0.42 (0.07; 1.92)	2.48 (0.54; 13.71)***
VChEa/ MDA	293 (101; 1741)	161 (66; 374)*
VChEb/ MDA	571 (251; 3295)	261 (195; 590)***
UREA*MDA*1000/ (VChEb*ALB)	0.18 (0.03; 0.96)	1.60 (0.56; 10.36)****

\* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ . Для оценки статистической значимости использован тест Манна-Уитни.

В группе умерших концентрация альбумина в сыворотке крови статистически значимо снижена на 11% по сравнению с выжившими (рис. 1А), при этом концентрация общего белка практически не меняется. Концентрация МДА в плазме крови умерших пациентов в 1.5 раза выше. Активность ВChЕа статистически значимо ниже на 29%, активность ВChЕb снижена в плазме крови умерших на 40% ( $p < 0.0001$ ) по сравнению с выжившими (рис. 1В).



**Рис. 1.** Биохимические показатели сыворотки и плазмы крови выживших и умерших пациентов с COVID-19. А, концентрация альбумина в сыворотке крови пациентов; В, активность ВChЕ по btch в плазме крови пациентов. Достоверные отличия между группами помечены знаками: \* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ . Для оценки статистической значимости использовали тест Манна-Уитни.

БХЭ содержится в организме в общей концентрации 680 нМ и обнаружена в плазме крови, печени, мозге, мышцах, слюне, почках, сердце, слизистой оболочке кровеносных сосудов, коже, толстой кишке, тонком кишечнике, селезенке и легких. Важнейшей функцией БХЭ является детоксикация органофосфатов путем образования с ними ковалентной связи. Ввиду того, что для БХЭ наилучшими субстратами являются эфиры, содержащие положительно заряженный фрагмент, этот фермент определяет период действия препаратов с анестезиологическим и миорелаксирующим эффектом, таких как новокаин, мивакурия хлорид, сукцинилхолин [6]. Данный фермент напрямую участвуют в процессах пищеварения и ожирения, т.к. одним из эндогенных субстратов БХЭ является грелин, гормон, вызывающий чувство голода [7]. У животных с высоким уровнем БХЭ в крови отмечено снижение уровня грелина в плазме. БХЭ превращает грелин в дезацил-грелин, у которого снижена аффинность к рецепторам GHSR1. Введение животным iso-ОМРА, специфического ингибитора БХЭ, возвращало

уровень грелина на прежний уровень. Снижение активности этого фермента ведет к чрезмерному набору веса. Это же было обнаружено у животных, получающих низкие дозы хлорпирифоса – ингибитора БХЭ [7]. БХЭ включена в процессы регулирования жирового обмена и ее активность коррелирует с различными показателями ожирения – окружность талии, содержание жира в печени, VFA, SFA, ИМТ, липидный статус сыворотки крови и степень резистентности к инсулину [8]. Заболевания печени (цирроз и хронический гепатит) также связаны с повышением активности БХЭ [9]. Что касается здорового пожилого населения, то не было обнаружено корреляции между уровнями BChE и пожилым возрастом, что позволяет предположить, что возраст сам по себе не связан со снижением активности БХЭ. Это важно понимать с учетом того, что пожилое население часто подвергается медикаментозному лечению и что эстеразы обычно в числе первых участвуют в метаболизме лекарств [10]. В настоящее время зарегистрировано более 70 естественных мутаций в БХЭ человека. Они влияют на каталитическую активность и/или экспрессию белка. Однако атипичный вариант (rs1799807) чаще всего связан с длительным апноэ [11]. Помимо генетического фактора, причинами снижения активности БХЭ являются беременность, тяжелые заболевания печени, ожоговые травмы и лекарственные взаимодействия [6]. Однако радикальное снижение активности БХЭ при заболевании COVID-19 не было ранее описано в научной литературе.

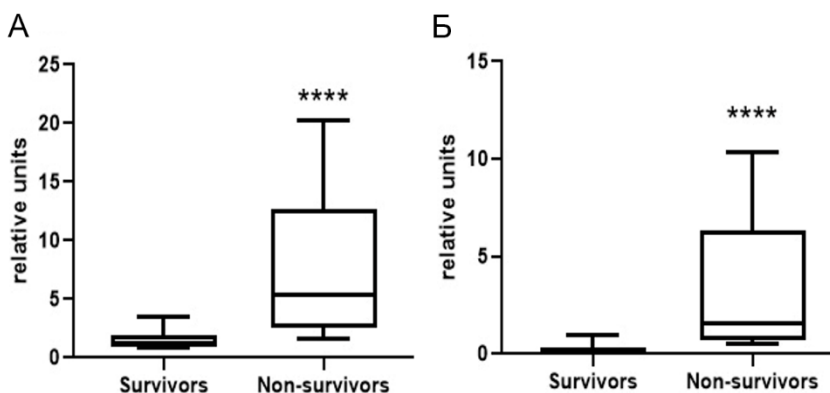
Эстеразная активность альбумина и активность параоксоназы-1 в плазме крови не претерпевает значительных изменений в рассматриваемых группах. Сохранение активности альбумина при снижении концентрации означает, что в силу разных факторов повышается его удельная активность.

В поисках индексов с повышенной диагностической значимостью были рассчитаны следующие соотношения (табл. 1): десятикратная концентрация мочевины к концентрации альбумина ( $UREA*10/ALB$ ), концентрация альбумина к концентрации МДА ( $ALB/MDA$ ), активность BChE по atch к концентрации альбумина ( $BChEa/ALB$ ), активность BChE по btch к концентрации альбумина ( $BChEb/ALB$ ), произведение концентраций МДА и креатинина к концентрации альбумина ( $Crea*MDA/ALB$ ), произведение концентраций МДА и мочевины к концентрации альбумина ( $UREA*MDA/ALB$ ), активность BChE по atch к МДА ( $BChEa/MDA$ ), активность BChE по btch к МДА ( $BChEb/MDA$ ), а также произведение концентраций МДА и мочевины к произведению активности БХЭ по btch и концентрации альбумина ( $UREA*MDA/(BChEb*ALB)$ ).

В группе умерших индекс  $UREA*10/ALB$  более чем в 4 раза выше, чем в группе выживших ( $p < 0.0001$ , рис. 2А). При введении в числитель индекса концентрации МДА значения в группах отличаются уже почти в



6 раз ( $p < 0.001$ , табл. 1). При дополнении этого индекса еще одним показателем – активностью BChEb в знаменателе – отличия между группами достигают максимального значения в 8.9 раз ( $p < 0.0001$ , рис. 2B). Этот индекс может претендовать на то, чтобы занять место среди наиболее перспективных индексов, предложенных к настоящему времени, среди которых нет ни одного, включающего активность БХЭ и демонстрирующего при этом столь разительные отличия на этапе поступления в клинику между выжившими и умершими в процессе лечения. Хотя большинство из предложенных индексов включают в себя альбумин в знаменателе: LDH/ALB, Lact/ALB, Fibr/ALB, Urea/ALB, CRP/ALB [12-21]. Корреляционный анализ, не зависящий от возраста и сопутствующей патологии, показал, что соотношение CRP/альбумин отрицательно коррелирует с  $SO_2$ , FEV1%, FVC% и DLCO% [22].



**Рис. 2.** Комбинированные индексы характеристик плазмы крови выживших и умерших пациентов с COVID-19. А, индекс «UREA\*10/ALB»; В, индекс «MDA\*UREA\*1000/(BChEb\*ALB)». \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ . Для оценки статистической значимости использовали тест Манна-Уитни.

Важно подчеркнуть доступность и дешевизну компонентов предлагаемого нами индекса для огромного количества лабораторий, не имеющих возможности проведения дорогостоящих анализов с целью определения показателей, повышенных при цитокиновом шторме (ферритин, прокальцитонин, тропонин, calprotectin, IL-6 и др. [23,24]).

Не удалось обнаружить статистически значимые отличия между группами при использовании индекса  $Crea*MDA/ALB$ . Этот «отрицательный» результат представляется не менее важным, чем многие «положительные» результаты, принимая во внимание высокую статистическую значимость отличий между группами тех индексов, в которых «почечным» маркером является мочевина. Это означает, что критическим патогенетическим фактором является не столько поражение

почек, сколько усиленный синтез мочевины, причем не только классическим путем в цикле мочевины в гепатоцитах, но и в эндотелиальных клетках из L-arginine вследствие активности аргиназ I и II, лишая eNOS субстрата для синтеза NO [25-28]. Повышение активности эндотелиальных аргиназ отмечено при COVID-19 [29].

**Заключение.** В настоящей работе была предпринята попытка переоценки представлений об эстеразном статусе плазмы крови, которая является одной из наиболее доступных и при этом наиболее насыщенной биомаркерами биологических матриц, представляющих большую ценность для диагностики. Мы исследовали эстеразный статус плазмы крови человека при патологии на примере пациентов с подтвержденным COVID-19. При поступлении в стационар, концентрация альбумина в плазме крови впоследствии умерших пациентов была снижена на 11% по сравнению с выжившими, тогда как концентрация МДА – в 1.5 раза выше. Особый интерес представляет достоверное снижение активности БХЭатч и БХЭбтч у умерших по сравнению с выжившими на 29% и 40% соответственно. Поиск индексов с повышенной диагностической значимостью позволил получить несколько таких индексов. Так, индекс UREA\*10/ALB в группе умерших оказался более чем в 3 раза выше по сравнению с выжившими, а при введении в числитель концентрации МДА разница между группами стала почти 6-кратной. Дополнение этого индекса активностью BChEb в знаменателе позволило достичь максимального отличия в 7.7 раза.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sokolovskaya L.G., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V. et al. // Chem. Biol. Defence 2004. 1-2(13-14): 21-31. [in Russ.]
2. Makhaeva G.; Rudakova E.; Richardson R. // Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2018. 1(3): e00028.
3. Li B., Sedlacek M., Manoharan I. et al. // Biochem. Pharmacol. 2005. 70(11): 1673-84.
4. Kou Y., Zou L., Liu R. et al. // J. Thromb Thrombolysis. 2019. 48(2): 187-94.
5. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Vovk M.A. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22: 10593.
6. Andersson M.L., Møller A.M., Wildgaard K. // Anaesthesia. 2019. 74(4): 518-28.
7. Brimijoin S., Chen V.P., Pang Y.P. et al. // Chem. Biol. Interact. 2016. 259(PtB): 271-5.
8. Iwasaki T., Yoneda M., Nakajima A., Terauchi Y. // Intern. Med. 2007. 46(19): 1633-9.
9. Cucuianu M., Opincaru A., Tapalagă D. // Clin. Chim. Acta. 1978. 85(1): 73-9.
10. Abou-Hatab K., O'Mahony M.S., Patel S., Woodhouse K. // Age Ageing. 2001. 30(1): 41-5.
11. Delacour H., Dedome E., Courcelle S. et al. // Ann. Biol. Clin. (Paris). 2016. 74(3): 279-85.

12. *Sipahioglu H., Onuk S.* // *Medicine* (Baltimore). 2022. 101(38): e30759.
13. *Sai I.N., Prasad R., Varsha T.V.* // *J. Assoc. Physicians India*. 2022. 70(4): 11-12.
14. *Anzo F.M., Buan-Mayo M.* // *Clin. Nutr. ESPEN*. 2023. 53: 134-43.
15. *Torun A., Çakarca T.D., Çakarca G., Portakal R.D.* // *Rev. Assoc. Med. Bras.* (1992). 2021. 67(3): 431-6.
16. *Makkar K., Sharma Y.P., Batta A. et al.* // *World J. Cardiol*. 2023. 15(1): 13-22.
17. *Yilmaz N., Tosun F., Comert E. et al.* // *Niger. J. Clin. Pract.* 2022. 25(10): 1745-50.
18. *Kalyon S., Gültop F., Şimşek F., AdaDM.* // *J. Int. Med. Res.* 2021. 49(9): 3000605211046112.
19. *Detsika M.G., Grigoriou E., Psarra K. et al.* // *In Vivo*. 2021. 35(6): 3305-13.
20. *Tocoglu A., Dheir H., Bektas M. et al.* // *J. Coll. Physicians Surg. Pak*. 2021. 30(1): S60-5.
21. *Feketea G.M., Vlacha V.* *Front Med* (Lausanne). 2020. 7: 566591.
22. *Afsin D.E., Kerget B.* // *Clin. Lab*. 2022. 68(8).
23. *Ducastel M., Chenevier-Gobeaux C., Ballaa Y. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(14): 7462.
24. *Semiz S.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2022. 12: 1038908.
25. *Chen F., Lucas R., Fulton D.* // *Front. Immunol.* 2013. 4: 184.
26. *Durante W.* // *Front. Immunol.* 2013. 4:111.
27. *Elms S., Chen F., Wang Y. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013. 305(5): H651-66.
28. *Li Z., Wang L., Ren Y. et al.* // *Cell Death Discov.* 2022. 8(1): 413.
29. *Durante W.* // *Metabolites*. 2022. 12(3): 240.

## АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ p53 И E2F1 В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

*Дзряян В.А., Гузенко В.В., Батальщикова С.А.*

Лаборатория «Молекулярная нейробиология»,  
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

**Введение.** Травмы периферических нервов (ТПН) – одна из актуальных проблем медицины и биологии не только в России, но и во всем мире. Одним из видов механического повреждения нервов является аксотомия т. е. перерезка аксона. С целью выявить молекулярные мишени для терапевтического вмешательства в предварительных исследованиях мы провели протеомный анализ на модели аксотомии беспозвоночных. В ходе анализа на протеомных микрочипах было показано, что основным эффектом аксотомии было одновременное повышение как про-, так и антиапоптотических белков. Среди них мы выделили p53 и E2F1 – глобальные регуляторы транскрипции и апоптоза [1].

Важнейшим регулятором биосинтеза белков в клетке являются эпигенетические модификации гистонов с участие

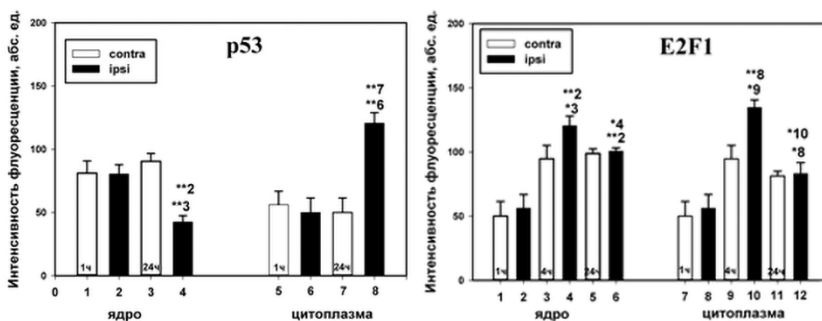
гистонацетилтрансфераз (НАТ) и гистоновых деацетилаз (HDAC). Посттрансляционному ацетилированию/деацетилированию с помощью НАТ и HDAC подвергаются не только гистоны, но и негистоновые белки, в том числе факторы транскрипции. Через ацетилирование/деацетилирование регулируется активность негистоновых белков, белок-белковые взаимодействия, их клеточная локализация, что определяет клеточный ответ [2]. Учитывая многообразие функций E2F1 и p53 в клетках, актуальным остается исследование механизмов регуляции этих белков при ТПН с участием HDACs.

**Цель работы.** Исследование процессов ацетилирования и деацетилирования факторов транскрипции p53 и E2F1 в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы млекопитающих в различные периоды после перерезки седалищного нерва.

**Материалы и методы.** Модель нейротравмы, используемая в настоящей работе – аксотомированные ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion), полученные путем перерезки седалищного нерва. Опыты с перерезкой седалищного нерва проводились на взрослых крысах-самцах (*Wistar*, беспородные), весом 200-250 г. Перерезку седалищного нерва и изоляцию DRG осуществляли согласно стандартному протоколу, описанному Savastano et al. [3]. Количественную ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген». Цитоплазматическая и ядерная фракции DRG были получены с помощью набора реактивов для экстракции CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (NXTRACT, Sigma). Образцы, содержащие 10-20 мкг белка в 15 мкл, подвергали электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле (7-12%) в присутствии додецилсульфата натрия в ячейке mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Методы иммуноблоттинга и двойной иммунофлуоресцентной микроскопии использованы для оценки экспрессии и внутриклеточного распределения ацетилированных форм E2F1 в клетках дорзальных ганглиев крыс. Иммуноблоттинг проводили методом полусухого переноса с помощью системы Trans blot Turbo через 1, 4, 24 часа или 7 дней после аксотомии, объединяя 4 и 5 DRG от трех крыс. Для иммуноблоттинга и двойной иммунофлуоресцентной микроскопии использовали следующие первичные кроличьи антитела против HDAC1 (SigmaAldrich SAB1400121, 1:500), или p53 (Sigma Aldrich SAB4503000, 1:500), или E2F1 (Sigma Aldrich SAB4500682, 1:500), или ацетилированного E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd, 1:500), или ацетилированного p53 (K373) (SigmaAldrich 06-916, 1:500) или каспазы 3 (SigmaAldrich C9598, 1:500) или активной каспазы 3 (SigmaAldrich AB3623, 1:500) или GAP-43 (SAB4300525, 1:500) или ацетилированному гистону H3 (K9) (SAB4500347; 1:500), или ацетилированному гистону H4 (06-598, Millipore; 1:500) и β-актину (A5441, 1:5000), а также против NeuN (маркер

нейронов) (SigmaAldrich MAB377, 1:1000). Для подтверждения факта межбелкового взаимодействия между AcE2F1(K120) / HDAC1 либо Acp53 (K373) / HDAC1 была проведена ко-иммунопреципитация с помощью набора компании Sileks с использованием магнитных частиц с белком G в соответствии с рекомендациями производителя (SileksMag-Protein G, кат. номер K0182). В полученном иммунопреципитате AcE2F1(K120) либо Acp53 (K373) определяли гистондеацетилазную активность HDAC1. Исследование проводили с использованием коммерческого набора твердофазного иммуноферментного анализа для HDAC1 (USCN Life Science, Ухань, Китай). Визуализация белок-белковых взаимодействий была проведена с помощью технологии Duolink® PLA (анализ бесконтактного лигирования) (Sigma-Aldrich). Для изучения механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после (перезрезки седалищного нерва были использованы ингибитор E2F1 HLM006474 (i.p. 100 мг/кг., 7 д.) [4] и неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия (i.p. 300 мг/кг., 7 д.) [2]. Статистическая обработка производилась с использованием t-критерия Стьюдента и метода ANOVA.

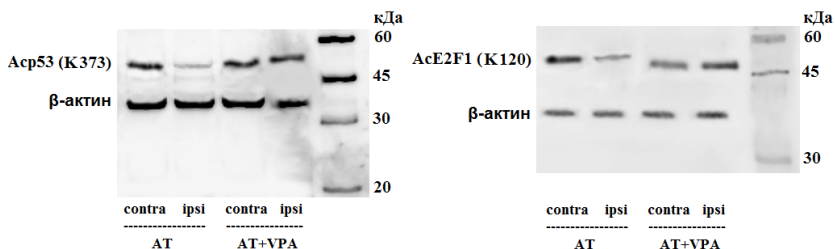
**Результаты.** 1. Результаты показали, что нейротравма вызывает увеличение уровня, а также транслокацию факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в нейронах в первые 24 часа после повреждения аксонов (рис. 1). Накопление p53 и E2F1 в цитоплазме нейронов указывает на дополнительную нетранскрипционную активность этих белков. Независимая от транскрипции проапоптотическая активность p53 и E2F1 может быть связана с их транслокацией в митохондрии и последующим усилением апоптоза.



**Рис. 1.** Уровень p53 и E2F1 в нейронах DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Обозначения: ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий. contra – неаксотомированный контрольный ганглий. 2-Way ANOVA. M ± SEM. n = 6. \* – p < 0.05; \*\* – p < 0.01.

2. Мы исследовали эффект ингибирования активности E2F1 на модели перерезки седалищного нерва. Мы показали, что внутрибрюшинное введение селективного ингибитора E2F1 в течение 7 дней после аксотомии оказывает выраженное нейропротекторное действие, а именно: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы 3, защищая аксотомированные ганглии от апоптоза, о чем свидетельствует достоверное снижение апоптотического индекса на фоне введения ингибитора [4]. Эти результаты говорят о том, что повышение экспрессии E2F1 может быть ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и отдаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и подготавливает последующие изменения других белков, в частности p53, уровень которого также повышался, и общий ответ клеток ганглии в ответ на повреждение.

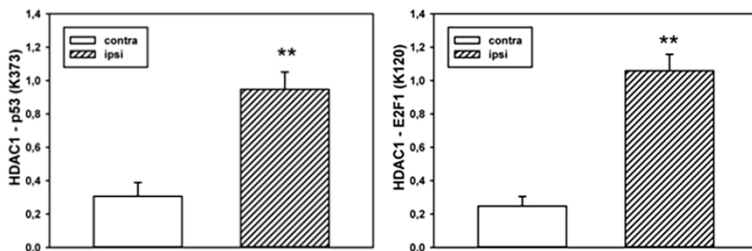
3. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в аксотомированных ганглиях происходит транслокация HDAC 1 из ядра в цитоплазму в первые 24 после повреждения [2]. Это происходит на фоне снижения уровня ацетилирования гистонов 3 и 4 – основных ядерных субстратов гистондеацетилаз 1 класса [2]. Таким образом, мы продемонстрировали вовлеченность HDAC 1 в реакцию клеток ганглиев на аксотомию. Важным является факт повышенного содержания этого белка в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев. Это указывает на дополнительную нетранскрипционную активность HDAC1. Обнаруженная нами в цитоплазме HDAC1 способна деацетилировать различные цитоплазматические белки, в том числе изученные нами факторы транскрипции p53 и E2F1, повышенное содержание которых мы также наблюдаем в аксотомированных нейронах, и активность которых регулируется путем посттрансляционных модификации, включая ацетилирование и деацетилирование по остаткам лизина.



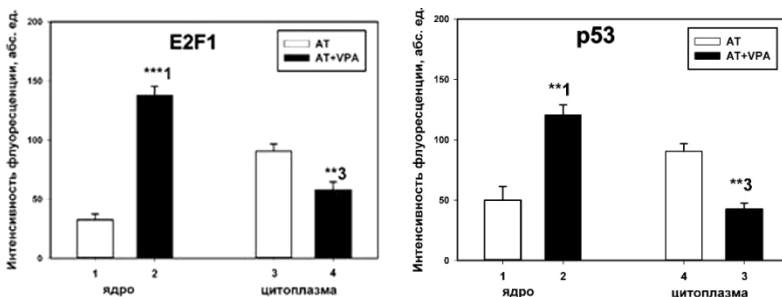
**Рис. 2.** Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень ацетилированных форм E2F1 (K120) и p53 (K373) в цитоплазматической фракции ипсилатерального (правого) ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левый) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии (AT). 2-Way ANOVA.  $M \pm$  стандартная ошибка среднего;  $n = 6$ ; \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ .

4. Проведенный вестерн-блот анализ продемонстрировал снижения уровня ацетилирования E2F1 по лизину 120 и p53 по лизину 373 в аксотомированных ганглиях крыс (рис. 2).

Это происходило на фоне увеличения деацетилазной активности в иммунопреципитате ацетилированных форм E2F1 и p53 (рис. 3). Повышение активности HDAC1, по-видимому, связано с последующим снижением ацетилирования факторов транскрипции E2F1 и p53.



**Рис. 3.** Активность HDAC1 в иммунопреципитате белка ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазматической фракции аксотомированного ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным ганглием (contra) через 24 часа после аксотомии. t-тест.  $M \pm SEM$ ; \* –  $p < 0.01$ ;  $n = 4$ .

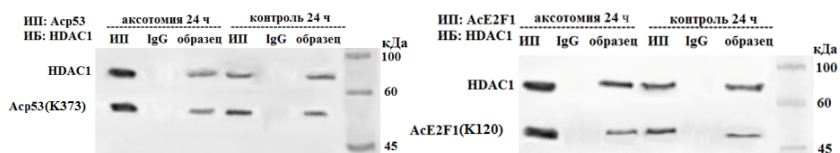


**Рис. 4.** Влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень p53 и E2F1 в нейронах DRG крысы через 7 суток после перерезки седалищного нерва. OneWay ANOVA.  $M \pm SEM$ .  $n = 6$ . \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ .

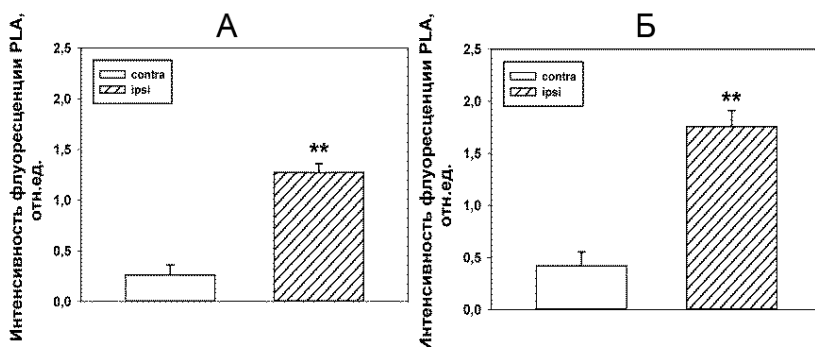
5. Для изучения механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы был использован неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия [2]. Ингибиторный эффект вальпроата натрия заключался в следующем: 1. Увеличивал уровень ацетилирования p53 по лизину 373 и E2F1 по лизину 120 в нейронах аксотомированных ганглиев, защищая их клетки от

апоптоза (рис. 2). 2. Снижал уровень E2F1 и p53 в цитоплазме, но увеличивал в ядре (рис. 4). Это говорит о том, что, во-первых, уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка.

6. Мы провели ко-иммунопреципитацию, данные которой показали, что HDAC1 действительно взаимодействует с ацетилированными формами E2F1 и p53 в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев (рис. 5).



**Рис. 5.** Результат вестерн-блот анализа ко-иммунопреципитации белка HDAC1 и Acp53 (K373) либо HDAC1 и AcE2F1 (K120) в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG крысы через 24 часа после повреждения. Контрольная группа: симметричные неповрежденные контралатеральные ганглии того же животного. Отрицательный контроль: нормальные IgG. Положительный контроль – исходный образец, не подвергшийся иммунопреципитации.



**Рис. 6.** Результаты Duolink *in situ* PLA: интенсивность флуоресценции сигналов PLA, представляющие взаимодействие Acp53 (K373)/HDAC1 (А) либо AcE2F (K120)/HDAC1 (Б) в аксотомированных ганглиях по сравнению с интактными ганглиями. t-тест. М ± SEM; \*\* –  $p < 0.01$ ; n = 3.

Для подтверждения белок-белковых взаимодействий мы также использовали технологию Duolink PLA, результаты которой подтвердили нашу теорию (рис. 6).

**Выводы.** Из вышесказанного следует, что проапоптотическое действие HDAC1 в аксотомированных ганглиях связано с регуляцией



уровня и внутриклеточной локализации факторов транскрипции p53 и E2F1 в результате их деацетилирования. Таким образом, селективное ингибирование HDAC1 и нижележащих сигнальных путей является основой для разработки новых терапевтических стратегий нейропротекции при повреждении нервов периферической нервной системы.

Выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A.* // J. Mol. Neurosci. 2019. 68(4):667-78.
2. *Dzreyan V.A., Rodkin S.V., Pitinova M.A., Uzdensky A.B.* // Mol. Neurobiol. 2021. 58(1): 217-28.
3. *Savastano L.E., Laurito S.R., Fitt M.R. et al.* // J. Neurosci. Methods. 2014. 227: 166-80.
4. *Dzreyan V., Eid M., Rodkin S., Pitinova M., Demyanenko S.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. 23(8): 4451.

## МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА СЕРДЦА

*Егоров Ю.В.*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России,  
Москва, Россия

**Введение.** Известно что, увеличение наполнения правого предсердия растягивает его стенку предсердия и влияет на ритм, генерируемый синоатриальным узлом (СУ). Механомодуляция активности СУ была впервые описана в 1915 г., когда Бэйнбридж (Bainbridge) наблюдал увеличение частоты сердечных сокращений при повышении центрального венозного давления (ЦВД), вызванного внутривенной инъекцией крови собакам [1]. Обнаруженный феномен получил название рефлекс Бейнбриджа, поскольку увеличение ЧСС в ответ на рост ЦВД связывали со снижением активности парасимпатических нервов, иннервирующих СУ. Позднее исследование, проведенное на собаках Brooks et al. [2] показало, что положительный хронотропный ответ нечувствителен к адренергическому воздействию, блокаде холинорецепторов, денервации, и, таким образом, может быть не связан с рефлекторной регуляцией. В 1963 году James и Nadeau

продемонстрировали отрицательную хронотропную реакцию СУ собак при введении жидкости в правое предсердие, контролируя температуру, рН, осмолярность, ионный состав и парциальное давление кислорода [3]. В 1978 г. Donald и Shepherd [4] разработали экспериментальный метод, который позволял избегать увеличения роста артериального давления, выявили механочувствительность пердсердного миокарда человека. Наконец, Cooreg и др. [5] определили, что умеренное растяжение изолированных клеток СУ приводит к увеличению скорости генерации ритма, подтверждая «первые, что положительный хронотропный ответ сердца на растяжения, по крайней мере частично, закодирован на уровне отдельных клеток водителя ритма синоатриального узла».

М. Naissaguerre с соавторами в 1998 [6] году показали, что миокардиальные рукава торакальных вен являются основными источниками предсердных тахикардий: вероятность того, что источник суправентрикулярных нарушений ритма будет располагаться в области устьев легочных вен (УЛВ) составляет около 95%, и около 4% – для области верхней полой вены (ВПВ). В 2019 году Egorov Y.V. [7] с соавторами показали, что УЛВ демонстрирует механочувствительность, а в 2020 Egorov Y.V. с соавторами [8] показали, что влияние нейромедиаторов на биоэлектрическую активность УЛВ сильно зависит от степени механического растяжения данной ткани. Модулирующее действие растяжения на эффекты нейромедиаторов в естественном пейсмекере сердца – СУ, ранее исследовано не было.

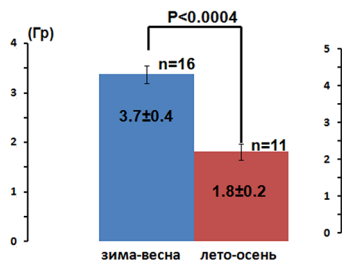
В связи с вышесказанным, целью данного исследования стало изучение влияния механического растяжения на холинергическую регуляцию электрической активности СУ и прилегающего к СУ миокарда ВПВ полученных от крыс стока Wistar (контрольные животные) и спонтанно гипертензивных крыс (SHR).

**Методика.** Опыты проводили на крысах Wistar массой  $400 \pm 50$  г и SHR ( $350 \pm 50$  г, демонстрирующих среднее артериальное давление  $196 \pm 10$  мм рт. ст.). Метод анестезии и состав экспериментальных растворов описаны ранее [7]. Для получения тканевых препаратов область правого предсердия и ВПВ освобождали от фасций, жировой ткани, после чего отпрепаровывали правое предсердие (ПП) вместе с ушком и участками ВПВ, исключая межпредсердную перегородку. Препарат помещали в перфузионную камеру, содержащую 2.5 мл р-ра Тироде комнатной температуры. После фиксации препарата на дне камеры раствор Тироде постепенно нагревали до  $37^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}$  в минуту. Перфузионной раствор оксигенировали газовой смесью (95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ ), добываясь  $\text{pH} = 7.35 \pm 0.05$ . Участок ВПВ, прилегающий к ПП, разрезали и разворачивали в камере таким образом, чтобы внешняя сторона препарата была обращена ко дну камеры, а «эндокардиальная» сторона — к экспериментатору. В экспериментах в камере ушко,

предсердие и вену выделяли как цельный препарат, отрезая огибающую ВПВ и НПВ. Препарат стимулировали в области ушка с периодом стимуляции  $S1-S1 = 200\text{мс}$ . Перфузию осуществляли со скоростью 18 мл/мин раствором Тироде при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Измерения электрофизиологических параметров проводили на том же оборудовании что описано в статье [7].

**Протокол исследования.** После окончания периода адаптации стимуляцию прекращали и проводили запись потенциалов действия (ПД) из предсердия и дистальной части ВПВ при ритме, генерируемом СУ в течении 5 минут, после чего в камеру поступал раствор Тироде, содержащий 1 мкМ ацетилхолина (АЦХ) в течение 30 мин. Последующие 30 минут осуществляли отмывку от АЦХ. После чего индуцировали механическое растяжение ткани при помощи грузов закрепленных в дистальной части ВПВ. Для SHR нагрузка составляла 0, 200, 400, 600, 800, 1000 мг. Для образцов ткани от крыс Wistar – 1, 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 г. Запись электрической активности осуществляли через 30 мин после установления новой нагрузки. Повышение нагрузки увеличивали до момента возникновения блока проведения волны возбуждения в дистальной части ВПВ.

Все величины, указанные в работе, представлены как средние значения, а их ошибки – стандартными ошибками среднего. Изменения в группе оценивали с помощью парного t-теста Стьюдента, различия между группами – при помощи t-теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

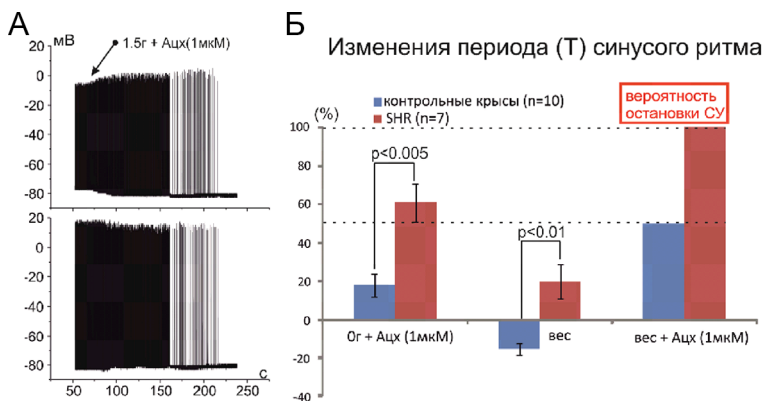


**Рис. 1.** Слева средние значения нагрузки на ВПВ, при которой возникал блок проведения в дистальной части ВПВ. Справа точками изображен вес при котором возникал блок проведения в дистальной части ВПВ в каждом эксперименте.

**Результаты.** На рисунке 1 слева показаны средние значения нагрузки на ВПВ при которой наступал блок проведения волны возбуждения в дистальной части ВПВ, справа приведены индивидуальные значения. Установлено, что крысы (линии Wistar) с мая по сентябрь демонстрируют большую механочувствительность, чем крысы с октября по апрель. Так блок проведения в дистальной части ВПВ возникал у

«летних» крыс при нагрузке  $1.8 \pm 0.2$  г ( $n = 11$ ) против  $3.7 \pm 0.4$  г ( $n = 16$ ) у «зимних» ( $p < 0.001$ ). SHR более чувствительны к растяжению: зимой блок проведения волны возбуждения в ВПВ возникал при  $0.5 \pm 0.1$  г ( $n = 10$ ).

В стандартных условиях АЦХ (1 мкМ) увеличивал период синоатриального ритма (т.е. оказывал отрицательный хронотропный эффект) у SHR достоверно больше, чем у крыс Wistar ( $61 \pm 10\%$  против  $18 \pm 6\%$ , соответственно, по отношению к контролю,  $p < 0.005$ ) (рис. 2). Растяжение у SHR приводило к достоверному увеличению периода ритма СУ на  $20 \pm 9\%$ , в то время как у Wistar период уменьшался на  $15 \pm 3\%$  ( $p < 0.01$ , SHR vs Wistar). Таким образом растяжение в синусовом узле крыс Wistar и SHR вызывает противоположные хронотропные эффекты. Одновременное воздействие растяжения и АЦХ (1 мкМ) у SHR приводило к подавлению автоматии СУ в 100% ( $n = 7$ ) экспериментов; у «летних» крыс Wistar «остановка» СУ происходила в 83% ( $n = 6$ ), хотя у «зимних» Wistar остановка СУ не наблюдалась ни в одном из экспериментов ( $n = 6$ ).



**Рис. 2.** А. Пример остановки ритма СУ при действии растяжения (1.5 г) и АЦХ = 1 мкМ у летней крысы Вистар. Б. Суммарные данные о действии растяжения и АЦХ = 1 мкМ на ритм СУ у контрольных крыс (летние – 1.5 г, зимние – 3.5 г) для SHR (0.5 г).

**Обсуждение и выводы.** Впервые выявлена чувствительность миокарда СУ и ВПВ к растяжению и показано, что эта чувствительность зависит от сезона. Поскольку крысы содержались в виварии по стандартам GLP мы исключаем влияние на данный результат таких воздействий как длительность светового дня, рацион, температурные воздействия и можем утверждать о циркадных ритмах, влияющих на сезонную уязвимость сердца животных. Похожая сезонная уязвимость известна и у человека, но ее зачастую связывают с неблагоприятными внешними условиями [9]. В норме СУ в летнее время (с мая по сентябрь) более чувствителен к холинергическим воздействиям. У спонтанно-гипертензивных крыс СУ

более уязвим к холинергическому воздействию и растяжению, чем у нормотензивных. В данной работе впервые продемонстрирован феномен механической модуляции холинергических эффектов в ритмоводителе сердца.

Работа выполнена в рамках НИОКТР-121031300188-6.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Bainbridge F.A.* // J. Physiol. 1915. 50: 65-84.
2. *Brooks C.M., Lu H.H., Lange G. et al.* // Am. J. Physiol. 1966. 211: 1197-202.
3. *James T.N., Nadeau R.A.* // Am J Physiol. 1963. 204: 9-15.
4. *Donald D.E., Shepherd J.T.* // Cardiovasc. Res. 1978. 12: 446-69.
5. *Cooper P.J., Lei M., Cheng L.X., Kohl P.* // J. Appl. Physiol. 2000. 89: 2099-104.
6. *Haissaguerre M., Jais P., Shah D.C. et al.* // N. Engl. J. Med. 1998. 339: 659-66.
7. *Egorov Y.V., Lang D., Tyan L. et al.* // J. Am. Heart Assoc. 2019. 8(20): e012748.
8. *Egorov Y.V., Rosenshtraukh L.V., Glukhov A.V.* // Myocardium. Front Physiol. 2020. 11: 237.
9. *Spencer F.A., Goldberg R.J., Becker R.C., Gore J.M.* // J. Am. Coll. Cardiol. 1998. 31(6): 1226-33.

## УЧАСТИЕ РЕЦЕПТОРА CD14 В АКТИВАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ АГОНИСТАМИ TLR4 и TLR2

*Зубова С.В.<sup>1</sup>, Косякова Н.И.<sup>2</sup>, Прохоренко И.Р.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН,  
Пушино, Россия

<sup>2</sup>Больница Пушкинского научного центра РАН, 142290 Пушкино, Россия

**Введение.** Липополисахариды (LPS) и липотейхоевые кислоты (LTA) представляют главные элементы клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий, соответственно. LTA рассматриваются как эквивалент LPS, ответственный за развитие септического шока, вызываемого грамположительными бактериями [1]. Эти провоспалительные агенты активируют клетки крови через рецепторы TLR4 и TLR2, экспрессированные, главным образом, на поверхности моноцитов и нейтрофилов. TLR4 был идентифицирован как специфический рецептор к LPS, индуцирующий синтез и высвобождение провоспалительных цитокинов [2]. TLR2 узнает диацелированные липопептиды (LTA) бактерий и также активирует клетки к синтезу цитокинов. В доставке LPS к TLR4 и LTA к TLR2 участвуют растворимый белок LBP и рецептор CD14 [3,4]. Для того чтобы TLR4 функционировал как рецептор LPS, необходим фактор миелоидной дифференцировки

MD-2 [5]. MD-2 физически ассоциирован с TLR2, но слабее, чем с TLR4 [6]. В отличие от TLR4, который в ответ на LPS передает сигналы, образуя гомодимер (TLR4)<sub>2</sub>, TLR2 при распознавании LTA формирует гетеродимер с TLR6 [7,8]. Связавшись с рецепторами LPS или LTA, активируют внутриклеточный сигнальный каскад через TLR4 или TLR2, приводящий к синтезу провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и хемокина IL-8 [9]. LPS целого ряда бактерий активируют клетки миелоидной линии не через TLR4, а через TLR2 [10,11]. К особенностям липидов А этих LPS относятся длина углеводородных цепей остатков жирных кислот, отличная от длины цепей энтеробактериальных LPS, наличие фосфорилированного диглюкозамина или присутствие разветвленных ацильных цепей [12]. Нетоксичный LPS грамотрицательной фототрофной бактерии *R. capsulatus* PG является антагонистом эндотоксинов [13]. Этот LPS способен блокировать активацию клеток крови эндотоксинами, приводящую к высвобождению широкого спектра провоспалительных цитокинов [14]. Синтетический аналог липида А из *R. capsulatus*, E5531, подавляет наработку TNF- $\alpha$  моноцитами крови человека, активированными LPS *E. coli* 0111:B4 или LTA *S. faecalis*, практически не проявляя собственной активности [15]. Структура нетоксичного липида А LPS *R. capsulatus* включает в дисахаридную основу дифосфорилэтиламин при C-1 и фосфорилэтиламин при C-4', а также ненасыщенную жирную кислоту (12:1) [16]. На основании этих структурных особенностей липида А мы предположили, что, подобно E5531, LPS *R. capsulatus* PG может конкурировать с LTA *Streptococcus pyogenes* за TLR2, блокируя активацию синтеза провоспалительных цитокинов клетками крови. Нами исследовалась, в частности, роль промежуточного рецептора CD14 в этом процессе.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на цельной крови здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 25 до 30 лет. Забор периферической крови осуществляли в клинических условиях с использованием вакутейнеров (Becton Dickinson and Company, Великобритания), обработанных гепарином натрия (17 ед/мл).

Для исследования влияния LPS и LTA на синтез цитокинов и хемокинов кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:10 и инкубировали с LPS *Escherichia coli* 055:B5 (100 нг/мл), LPS *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium (100 нг/мл), LTA *Streptococcus pyogenes* (1000 нг/мл) (Sigma-Aldrich, USA) или LPS *R. capsulatus* PG (1000 нг/мл) в различных сочетаниях в течение 6 и 24 часов при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. LPS *R. capsulatus* PG был получен согласно методике, описанной ранее [17]. Для определения антагонистического действия LPS *R. capsulatus* PG в отношении LPS *E. coli*, *S. enterica* или LTA *S. pyogenes*, кровь в течение 30 мин предынкубировали с LPS *R. capsulatus* PG, после чего добавляли соответствующий LPS или LTA. Для определения роли рецептора CD14 в

активации клеток, кровь предварительно инкубировали с АТ CD14 (2 мкг/мл) (Purified Anti-human CD14 Clone M5E2, BioLegend, США) в течение 30 мин при 4°C, а затем добавляли LPS или LTA. Образцы инкубировали в течение 6 и 24 часов при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин). Супернатанты отбирали и хранили при -20°C до определения содержания цитокинов и хемокинов.

*Содержание цитокинов и хемокинов* определяли с помощью наборов для ИФА TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 (Вектор-БЕСТ, Россия) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов определяли на ИФА-анализаторе STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

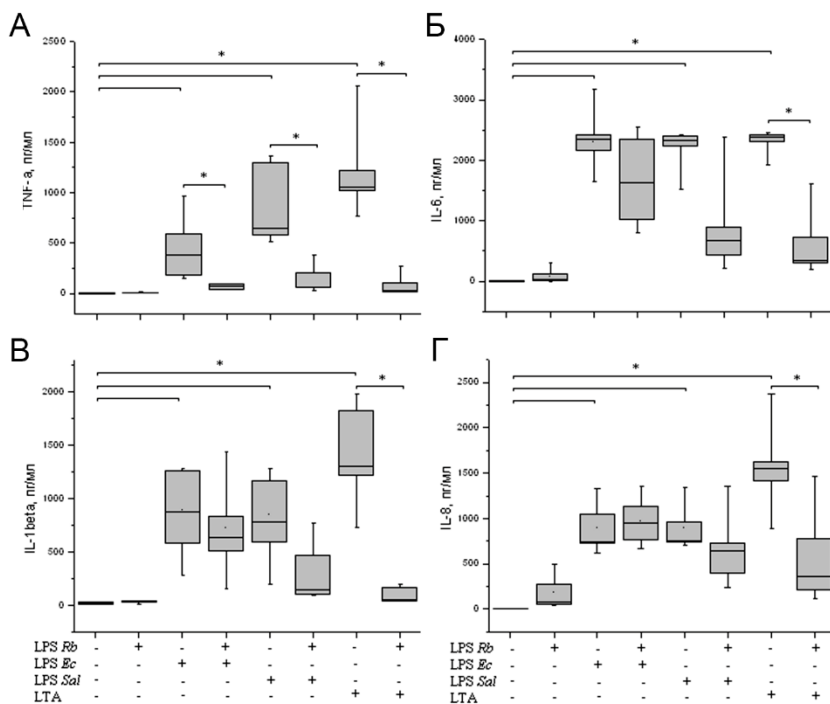
*Статистическую обработку* и графическое представление результатов проводили методами непараметрической статистики в Origin Pro 7.5 и Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat). Результаты представлены в виде медианных значений с верхним и нижним квартилями (IQR). Достоверность различий между медианными значениями определяли по критерию Манна-Уитни ( $p < 0.05$ ).

**Результаты.** LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* стимулировали значительную, близкую по величине, наработку клетками крови провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ , а также хемокина воспаления IL-8, продукция которых достоверно превышала контрольные значения (рис. 1). В ответ на активацию LTA также нарабатывались высокие уровни исследуемых цитокинов и хемокинов. Нарботка более позднего цитокина IL-1 $\beta$  и хемокина IL-8 в ответ на LTA *S. pyogenes* превышала уровни, синтезируемые при активации посредством LPS *E. coli* или LPS *S. enterica*.

Нетоксичный LPS *R. capsulatus* PG в концентрации, превышающей концентрацию эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica* в 10 раз, и в равной концентрации с LTA *S. pyogenes* не стимулировал клетки к наработке TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ . Количество хемокина IL-8 в крови в ответ на LPS *R. capsulatus* PG незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, но было значительно ниже, чем при активации клеток крови эндотоксинами или LTA *S. pyogenes*. Исследование защитного эффекта LPS *R. capsulatus* PG от действия эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica* показало, что LPS *R. capsulatus* PG подавлял синтез цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  в крови. В отношении хемокина IL-8 защитного эффекта LPS *R. capsulatus* PG от действия эндотоксинов не наблюдалось.

При активации клеток LTA *S. pyogenes* предварительная инкубация крови с LPS *R. capsulatus* PG приводила к значительному достоверному снижению синтеза исследуемых провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  и хемокина IL-8. Из полученных результатов следует, что LPS *R. capsulatus* PG проявляет антагонистическую активность не только в

отношении эндотоксинов, но также и в отношении LTA *S. pyogenes*. Эффективность защиты LPS *R. capsulatus* PG от активации клеток агонистами к синтезу цитокинов снижалась в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli*.



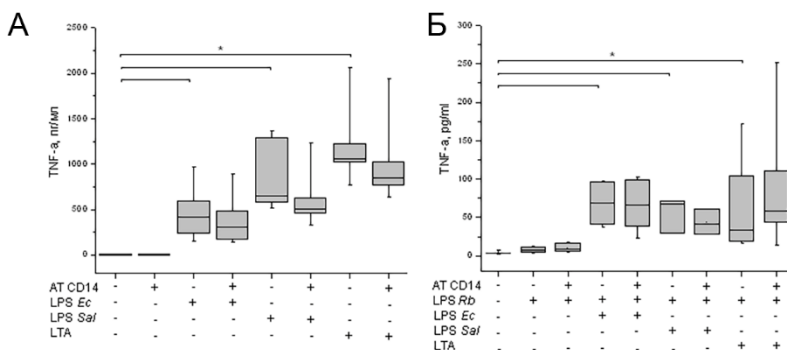
**Рис. 1.** Влияние LPS *R. capsulatus* PG на секрецию TNF-α (А), IL-6 (Б), IL-1β (В), IL-8 (Г) при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *S. enterica* или LTA *S. pyogenes*, n = 7. \*p < 0.05.

В передаче сигнала клетке, как от LPS, так и от LTA, критическую роль играет рецептор CD14, который участвует не только в узнавании лигандов рецепторами TLR4 и TLR2, но и в активации клеток к синтезу цитокинов [18]. Для проверки этого предположения и понимания механизма подавления активации клеток крови посредством LPS *R. capsulatus* PG, мы блокировали рецепторы CD14 с помощью mAT до активации агонистами LPS или LTA (рис. 2А).

Предварительная инкубация крови с AT CD14 при последующей активации клеток LPS *E. coli*, LPS *S. enterica* или LTA *S. pyogenes* более выражено снижала синтез TNF-α, индуцированный LTA в сравнение с эндотоксинами. Полученные результаты показали, что CD14 участвует в активации и передаче сигнала на синтез цитокинов от LPS и LTA, причем



это участие снижается в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli* (рис. 2А), аналогично снижению эффективности защиты LPS *R. capsulatus* PG от активации клеток используемыми агонистами (рис. 1А).



**Рис. 2.** Влияние AT CD14 (А) и совместное влияние AT CD14 и LPS *R. capsulatus* PG (Б) на секрецию TNF-α при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *S. enterica* или LTA *S. pyogenes*, n = 7. \*p < 0.05.

Блокировка CD14 антителами практически не влияла на защитный эффект LPS *R. capsulatus* PG от активации клеток крови эндотоксинами (рис. 2Б). Это может указывать на то, что защита клеток от действия эндотоксинов посредством LPS *R. capsulatus* PG происходит, по-видимому, на уровне блокировки рецепторного комплекса TLR4/MD-2. Причиной этого может быть более низкая константа связывания LPS *R. capsulatus* PG с CD14, чем константа связывания LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* с CD14, аналогично E5531 [15].

AT CD14 снижали защитный эффект LPS *R. capsulatus* PG при активации клеток крови посредством LTA *S. pyogenes*. Можно предположить, что LPS *R. capsulatus* PG, связавшись с CD14, блокирует связывание CD14 с LTA *S. pyogenes* и последующую передачу сигнала к рецепторному комплексу TLR2/TLR6. В этом случае константа связывания LPS *R. capsulatus* PG с CD14, по-видимому, превосходит таковую для LTA *S. pyogenes*. Константа связывания воспалительных агентов с рецептором CD14 снижается в ряду LTA *S. pyogenes* < LPS *R. capsulatus* PG < LPS *S. enterica* < LPS *E. coli*, что отражается в эффективности защиты клеток крови от активации этими агонистами посредством LPS *R. capsulatus* PG.

Результаты работы показывают, что нетоксичный LPS *R. capsulatus* PG блокирует синтез провоспалительных цитокинов при активации клеток крови, как эндотоксинами, так и LTA *S. pyogenes*. LPS *R. capsulatus* PG может быть прототипом для создания препаратов, защищающих как от LPS грамотрицательных, так и от LTA грамположительных бактерий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ginsburg L. // *Lancet. Infect. Dis.* 2002. 2(3): 171-9.
2. Zhang G., Meredith T.C., Kahne D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2013. 16(6): 779-85.
3. Schroder N.W.J., Morath S., Alexander C. et al. // *Biol. Chem.* 2003. 278(18): 15587-94.
4. Ryu J.-K., Kim S.J., Rah S.-H. et al. // *Immunity.* 2017. 46(1): 1-13.
5. Shimazu R., Akashi S., Ogata H. et al. // *J. Exp. Med.* 1999. 189(11): 1777-82.
6. Dziarski R., Wang Q., Miyake K. et al. // *J. Immunol.* 2001. 166(3): 1938-44.
7. Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D. et al. // *PNAS.* 2000. 97(25): 13766-71.
8. Henneke P., Morath S., Uematsu S. et al. // *Immunol.* 2005. 174(10): 6449-55.
9. Su S.-H., Hua K.-F., Lee H. et al. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. 374(1-2): 106-15.
10. Yokota S., Ohnishi T., Muroi M. et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007. 51(1): 140-8.
11. Girard R., Pedron T., Uematsu S. et al. // *J. Cell Sci.* 2003. 116(2): 293-302.
12. Erridge C., Pridmore A., Eley A. et al. // *J. Med. Microbiol.* 2004. 53(8): 735-40.
13. Прохоренко И.П., Грачев С.В., Зубова С.В. // Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010.
14. Zubova S.V., Grachev S.V., Prokhorenko I.R. // *Immunobiology.* 2021. 226(152030): 1-8.
15. Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P. et al. // *Br. J. Pharmacology.* 1999. 127(4): 853-62.
16. Krauss J.H., Seydel U., Weckesser J., Mayer H. // *Eur. J. Biochem.* 1989. 180(3): 519-26.
17. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.П. // 1996. 32(4): 444-7.
18. Zanoni I., Ostuni R., Marek L.R. et al. // *Cell.* 2011. 147(4): 868-80.

### ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ HSP40 В КЛЕТКАХ КРОВИ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

Кандалова О.В.<sup>1</sup>, Елистратова И.В.<sup>2</sup>, Ляпон А.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МГМСУ им. А.И. Евдокимова, кафедра дерматологии и венерологии, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России», Балашиха, мкр. Никольско-Архангельский, Московская область, Россия

**Введение.** Стресс является одной из причин обострения atopического дерматита (АД) у взрослых людей [1]. При этом в клетках активируются многочисленные сигнальные пути, часть из которых сопряжена с белками теплового шока (**H**eat **S**hock **P**roteins). Так исторически называют систему молекулярных шаперонов, которые классифицируются на основании их молекулярной массы, они формируют суперсемейство, состоящее из HSP110, HSP90, HSP70, HSP40, малых

белков теплового шока и шаперонинов. Эти белки защищают от деградации основные белковые комплексы в клетке, контролируют качество сборки белков, доставляют поврежденные белки к протеасомам, но основная их функция – защита клеток от последствий стресса. Ко-шапероны HSP40 переносят полипептиды на белки HSP70, предотвращают агрегацию неправильно собранных полипептидов. HSP40 формирует комплекс с HSP70, при этом связывает нуклеотид-связывающий домен HSP70 и повышает АТФазную активность HSP70. Белки HSP40 также могут связывать HSP90 и выполнять роль ко-шаперонов при фолдинге нативных и поврежденных белков, перемещении полипептидов через клеточные мембраны. Кроме того, белки HSP40 выполняют ряд регуляторных функций вне клеток [2].

У человека семейство HSP40 включает 49 белков, из них в подсемейство А белков HSP40 входят 4 белка, в подсемейство В – 14 белков, к подсемейству С относятся 30 белков, выполняющих функции шаперонов и ко-шаперонов во всех компартментах клетки [3]. Семейство белков HSP40 также называется DnaJ по аналогии с такими белками у *E. coli*. Все белки HSP40 включают консервативный J домен и классифицируются на основании его структурной организации. Наличие J домена является обязательным для работы всех белков семейства HSP40 как ко-шаперонов, так как взаимодействие между белками осуществляется через связывание последовательностей в J домене. J домен также способен связывать ДНК.

**Подсемейство А HSP40.** Одним из белков подсемейства А из HSP40 является Tid1 (Tumorous imaginal discs), (или DnaJA3/Tid1), который первоначально был открыт у мушек дрозофил и назывался DroJ2. Функциональная активность белков DnaJA3/Tid1 показана в митохондриях, цитозоле, плазматической мембране. DnaJA3/Tid1 работает как стресс-индуцированный шаперон и поддерживает нормальное функциональное состояние митохондрий, препятствует агрегации белков первого комплекса дыхательной цепи митохондрий. Любое резкое изменение уровня DnaJA3/Tid1 инициирует фрагментацию митохондрий и снижает жизнеспособность клеток. В условиях гипоксии DnaJA3/Tid1 формирует комплекс с супрессором p53, что способствует его перемещению в митохондрии, где инициируется p53-зависимый апоптоз.

Ген *Tid1* человека имеет локализацию 16p13.3, занимает 34 kb и состоит из 12 экзонов. Три альтернативных сплайсинговых варианта гена *Tid1* продуцируют цитозольные белки M 50 кДа, 48 кДа, 46 кДа и митохондриальные белки M 43 кДа, 40 кДа, 38 кДа. Белки с молекулярной массой 43 кДа и 40 кДа (соответственно, Tid1L и Tid1S (длинная и короткая изоформы)), различаются в С-концевом домене [4]. Цитозольный DnaJA3/Tid1 50 кДа – это ключевой медиатор макроаутофагии, он

взаимодействует с комплексом Beclin-1/Phosphoinositol-3 kinase и связывает этот комплекс с I-κB киназой NF-κB. DnaJA3/Tid1 повышает стабильность и увеличивает время нахождения в цитозоле ингибиторного киназного комплекса (ИКК) путем связывания J домена с I-κBαβ и ИККαβ субъединицами комплекса NF-κB/I-κB. Регуляция осуществляется на уровне фосфорилирования I-κB киназы [5]. DnaJA3/Tid1 подавляет сигнальные пути NF-κB, активированные фактором некроза опухолей (TNF-α), взаимодействует с рецептором интерферона гамма IFN-γ-R2 и модулирует сигнальные пути IFN-γ и транскрипцию зависимых от него генов. В митохондриях есть длинные и короткие изоформы DnaJA3/Tid1. В митохондриях DnaJA3/Tid1 локализуется в нуклеотидах – связанных с ДНК белковых комплексах, его клиентным белком является α-субъединица ДНК-полимеразы-γ, что обеспечивает его связь с митохондриальным геномом. Длительное ингибирование DnaJA3/Tid1 в клетках приводит к потере митохондриальной ДНК, нарушениям в дыхательной цепи и снижению потребления кислорода клеткой.

DnaJA3/Tid1 регулирует рост нервов, индуцированный NGF (Nerve Growth Factor). Высокоаффинный рецептор NGF TrkA (Tyrosine kinase receptor A) проводит сигналы пролиферации и дифференцировки. Экспрессия TrkA зависит от интерлейкинов (IL)-4 и IL-13, которые секретируются Т-хелперами второго порядка (Th2). В коже человека экспрессия TrkA в пролиферирующих базальных кератиноцитах существенно увеличивается при АД. Повышение продукции Th2 цитокинов при АД обуславливает TrkA-зависимую гиперпролиферацию кератиноцитов [6]. При АД Th2 нарушают терминальную дифференцировку кератиноцитов, что приводит к ослаблению барьерной функции кожи; в этом процессе играет роль сигнальный путь с участием JAK2 (Janus kinase 2) и STAT (Signal Transducer and Activator Transcription). STAT3 участвует в дифференцировке кератиноцитов, а STAT6 – в активации и продукции хемокинов. Оба сплайсинговых варианта белка DnaJA3/Tid1 прямо взаимодействуют с киназой Jak2 на уровне плазматической мембраны. Ингибиторы JAK киназы супрессируют активность сигнального пути STAT3, что существенно улучшает состояние кожи при АД [7]. В клетках крови DnaJA3/Tid1 связывается со STAT5b своим J доменом и негативно регулирует его экспрессию и транскрипционную активность.

DnaJA3/Tid1 необходим для дифференцировки Т-клеток в тимусе, он регулирует апоптоз тимоцитов за счет взаимодействия с митохондриальным белком bcl-2. Короткая изоформа DnaJA3/Tid1 (Tid1S) селективно экспрессируется на Th2 клетках при их активации, что сопряжено с резистентностью Th2 к апоптозу. Повышение экспрессии длинной изоформы DnaJA3/Tid1 (Tid1L) обуславливает ингибирование

пролиферации и индукцию апоптоза. У больных АД экспрессия DNAJА3/Tid1 в лимфоцитах периферической крови максимальна при легкой степени Ад и прогрессивно снижается по мере усиления активности процесса. Экспрессия DNAJС15/MСJ в Th2 клетках достоверно выше, чем в Th1 клетках при тяжелом течении АД [8].

**Подсемейство В HSP40.** Белки подсемейства В HSP40 – это гомодимеры, имеют последовательность, распознающую мотив EEVD на С-конце белков HSP70, ко-шаперонами которых они являются. Мутации в J-домене белков HSP40 (DNAJB2, DNAJB6, DNAJС5, DNAJС6, DNAJС13, DNAJС19, DNAJС29) приводят к заболеваниям человека [9].

В нейтрофилах и лимфоцитах больных АД (по сравнению со здоровыми донорами) повышена экспрессия внутриклеточного белка DNAJB6/MRJ. Максимальный уровень экспрессии DNAJB6/MRJ регистрируется в острой фазе АД и при наиболее тяжелом течении заболевания. По мере перехода АД в подострую стадию уровень экспрессии белка DNAJB6/MRJ постепенно снижается [10].

В лимфоцитах DNAJB6/MRJ супрессирует клеточный цикл, а также ингибирует транскрипционную активность NFATc3 (Nuclear factor of activated T cells), который в ядре взаимодействует с гистон-деацетилазой II класса и снижает аффинность связывания NFATc3 с промоторами соответствующих генов. Сигнальные пути DNAJB6/MRJ включают в качестве вторичных мессенджеров циклин-зависимые киназы (cdk) и гистон-деацетилазу (HDAC4), ингибирующую прохождение клеточного цикла. В паре с HSP70 DNAJB6/MRJ блокирует NO–индуцированный апоптоз макрофагов путем ингибирования транслокации белка Вах к митохондриям.

Альтернативный сплайсинг гена *mj* дает две изоформы белка – DNAJB6a (36 кДа, 326 а.к.о.) и DNAJB6b (26 кДа, 242 а.к.о.). DNAJB6a локализуется в ядре, а DNAJB6b – преимущественно в цитозоле. В ответ на стресс повышается концентрация белка DNAJB6 в ядре за счёт перемещения туда его малой изоформы. DNAJB6b проявляет свойства, противоположные действию DNAJB6a, и работает как промотор пролиферации, в М-фазе клеточного цикла уровень белка DNAJB6/MRJ в клетке повышается. DNAJB6/MRJ предотвращает агрегацию кератинов, регулирует обмен кератинов K8/K18 – промежуточных филаментов эпителия, оказывает влияние на клеточный цикл кератиноцитов и эпителиальных клеток [11].

**Подсемейство С HSP40.** В ответ на стресс, инициированный в органеллах, в ядре клетки повышается транскрипционная активация генов и синтез белков, регулирующих развитие стресса в этих органеллах. Помимо активности в эндоплазматическом ретикулуме и в цитозоле, ко-шапероны HSP40 играют важную роль при стрессе в митохондриях. В митохондриях человека обнаружено несколько белков семейства HSP40.

Белок DNAJC15 (или MCJ – **M**ethylation **C**ontrolled **J** protein, DNAJC15/MCJ), имеет 75% гомологии с идентичными белками клеток других млекопитающих и более 57% гомологии с клетками прокариот и низших эукариот. DNAJC15/MCJ заякорен С-концом во внутреннюю мембрану митохондрий, а его J домен направлен в сторону матрикса митохондрии. DNAJC15/MCJ – это эндогенный митохондриальный репрессор электронно-транспортной (дыхательной) цепи, он препятствует формированию суперкомплексов из белков дыхательной цепи. DNAJC15/MCJ участвует в биогенезе митохондрий, взаимодействует с компонентами первого комплекса дыхательной цепи митохондрий, регулирует митохондриальные поры (**M**itochondrial **P**ermeability **T**ransition **P**ore, MPTP): повышение его экспрессии способствует открыванию пор и инициирует апоптоз, тогда как снижение его экспрессии блокирует активность пор и повышает способность клеток к выживанию [12].

DNAJC15/MCJ формирует комплексы с митохондриальным мотором и регулятором транслоказ MAGMAS, обеспечивающим импорт пре-белков через мембрану митохондрий. DNAJC15/MCJ транспортирует MAGMAS к индивидуальной транслоказе, требуемой для переноса специфичного белка. DNAJC15/MCJ взаимодействует с препротейнотранслоказой внутренней мембраны митохондрий TIM23 (**T**ranslocase of the **I**nnner **M**itochondrial membrane), компонентом которой является митохондриальный HSP70 морталин (mortalin). DNAJC15/MCJ стимулирует АТФ-азную активность морталина и обеспечивает работу транслоказы TIM23 [13].

Ген *mcj* человека имеет локализацию 13q14, его экспрессия высока в CD8+ Т-лимфоцитах и почти не определяется в CD4+ Т-хелперах и в В-клетках, уровень белка DNAJC15/MCJ высок в цитотоксических лимфоцитах, а в хелперах существенно ниже. Эти различия могут определяться тем, что активированные цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты являются источником секретируемого IFN- $\gamma$ . Ген *mcj* является транскрипционной мишенью IFN- $\gamma$ , обуславливающей динамическую адаптацию тканей к стрессу. У больных АД в дерме и в эпидермисе в зоне воспаления кожи повышено содержание CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$ , IL-13 и IL-22 [14]. IFN- $\gamma$  репрессирует транскрипцию гена *mcj* в макрофагах, его экспрессия регулируется в ответ на воспалительные стимулы. Ген *mcj* необходим для продукции TNF- $\alpha$  макрофагами в ответ на связывание TLR рецепторов бактерий.

Нашими работами показано, что у больных атопическим дерматитом (по сравнению со здоровыми лицами) повышена экспрессия молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ в CD8+ цитотоксических лимфоцитах периферической крови. Экспрессия белка DNAJC15/MCJ взаимосвязана с чувствительностью нейтрофилов к индукторам апоптоза.

Также экспрессия этого белка повышается в нейтрофилах больных АД при бактериальной контаминации кожи [15].

**Заключение.** В данной работе приведены примеры связи патогенеза atopического дерматита с сигнальными белками стресса, в частности, с белками семейства HSP40. Это самое многочисленное семейство шаперонов в суперсемействе белков теплового шока. Благодаря своим уникальным свойствам белки HSP40 регулируют многочисленные сигнальные пути и функции в клетке, а также играют роль в межклеточном взаимодействии. Основная наша задача при изучении этих белков – это попытаться использовать их для создания новых препаратов для лечения atopического дерматита. Уже сейчас на основании структуры белков HSP40 созданы ингибиторы для лечения онкологических заболеваний. Понимание механизма действия HSP40 при atopическом дерматите также ускорит создание препаратов, блокирующих развитие воспаления в коже при atopическом дерматите.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Елистратова И.В.* // Патогенез. 2018. 16(4): 157-60.
2. *Braun J.E.* // J. Biol. Chem. 2023. 299(2): 102840.
3. HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee), Available at [www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40](http://www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40).
4. *Yin X., Rozakis-Adcock M.* // Gene. 2001. 278(1-2): 201-10.
5. *Momiuchi Y., Kumada K., Kuraishi T. et al.* // J. Biol. Chem. 2015. 290(39): 23816-25.
6. *Matsumura S., Terao M., Murota H., Katayama I.* // J. Dermatol. Sci. 2015. 78(3): 215-23.
7. *Atano W., Nakajima S., Kunugi H. et al.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2015. 136(3): 667-77.
8. *Елистратова И.В., Гречко А.В., Морозов С.Г., Юркив В.А.* // Патогенез. 2016. 14(1): 67-71.
9. *Koutras C., Braun J.* // Front. Cell. Neurosci. 2014; 8(8):191-8.
10. *Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г.* // Патол. Физиол. Эксп. Тер. 2016. 60(3): 23-30.
11. *Dey S., Banerjee P., Saha P.* // Mol. Cell. Biochem. 2009. 322(1-2): 137-42.
12. *Hatle K., Gummadijala P., Navasa N. et al.* // Mol. Cell. Biol. 2013. 33(11): 2302-14.
13. *Schusdziarra C., Blanowska M., Azem A., Hell K.* // Hum. Mol. Genet. 2013. 22(7): 1348-57.
14. *Hijnen D., Knol E., Gent Y. et al.* // J. Invest. Dermatol. 2013. 133(4): 973-9.
15. *Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Захарова И.А. и др.* // Патол. Физиол. Эксп. Тер. 2016. 60(2): 4-12.

# ЭКТОПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ВКУСОВЫХ И ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КЛЕТКАХ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА И ЛИНИИ MIN6

*Коваленко Н.П., Кабанова Н.Н., Копылова Е.Е., Ковалицкая Ю.А., Быстрова М.Ф., Масулис И.С.*

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

**Введение.** Исследование рецепторного репертуара клеток, осуществляющих синтез и секрецию факторов регуляции метаболизма углеводов, представляет особый интерес с точки зрения поиска мишеней для направленного воздействия на функции этих клеток. Центральную роль в регуляции уровня и метаболизма глюкозы играют клетки островков Лангерганса и гепатоциты, способные реагировать на десятки эндогенных гормональных сигналов и уровень метаболитов в сыворотке крови. Представление об экспрессии ограниченного спектра специализированных рецепторных белков, вовлеченных в реализацию функций клеток поджелудочной железы и печени по принципу обратной связи, пересматривается в связи с обнаружением рецепторов, характерных для иных типов тканей, отличных по своему метаболическому профилю и роли в организме. Это относится в первую очередь к гептаспиральным рецепторам, участвующим в восприятии вкусовых и обонятельных сигналов.

Обонятельные рецепторы (ОР) млекопитающих представляют собой наиболее многочисленное семейство хеморецепторов, представленное в геноме человека 816 генами, половина (425) из которых являются псевдогенами. У грызунов (мышь, крыса) аннотировано 1130 и 1207 генов ОР соответственно [1]. Такое разнообразие связывают с дупликацией и последующей изменчивостью генов семейства в процессе эволюции, адаптировавшей обоняние к восприятию большого разнообразия физиологически значимых сигналов химической природы. Длительное время доминирующей концепцией было представление об избирательной экспрессии генов обонятельных рецепторов в нейронах обонятельного эпителия (ОЭ), причем считалось, что зрелые изолированные клетки презентуют на мембране один определенный вид рецептора (правило «один нейрон-один рецептор») [2]. Развитие технологии транскриптомного анализа на уровне одиночных клеток (scRNA seq) выявило феномен ко-экспрессии нескольких рецепторных белков семейства как в процессе созревания обонятельных нейронов [2], так и в дифференцированных клетках [3]. В то же время, начиная с 2003 г.,



появляются данные о наличии функциональных обонятельных рецепторов в других тканях: тестикулах [4], корковых нейронах [5], кератиноцитах, гепатоцитах [6]. Избирательная экспрессия генов ОР была подтверждена для некоторых видов опухолевых клеток [7]. Такая диверсификация функций ОР указывает на их потенциальную роль в восприятии сигнальных молекул, циркулирующих во внутренней среде организма, позволяет рассматривать их как элемент хемосенсорного аппарата тканей и органов и мишень для направленного воздействия на функциональное состояние клеток [8]. В данной работе было проведено типирование транскриптов генов ОР и вкусовых рецепторов в популяции бета-клеток островков Лангерганса и линии клеток инсулиномы MIN6, считающейся моделью инсулин-секретирующих клеток поджелудочной железы, и в индивидуальных моноклонах MIN6.

**Методы исследования.** Островки Лангерганса выделяли из поджелудочной железы мышей возраста 12-18 недель, железу обрабатывали при 37°C ферментом Коллагеназа П (Roche, 0,8 мг/мл) на орбитальном шейкере в течение 15-17 мин, очистку островков осуществляли последовательным центрифугированием (4 мин при 300 г) в буфере Хенкса. Сбор островков проводили вручную с помощью механического дозатора (20 мкл) под бинокляром. Островки золотисто-коричневого цвета с ровными краями, без признаков некроза центральной части отбирали для экспериментов. Для одного выделения тотальной РНК использовали 170-200 островков, что составляет примерно 300-500 тыс. клеток.

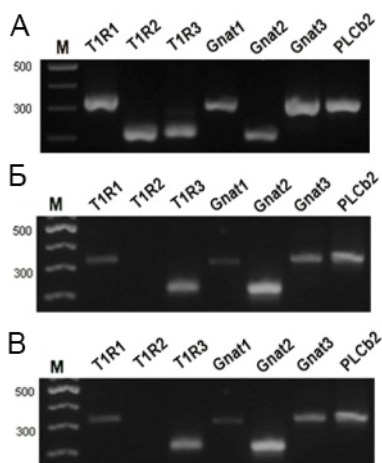
Клетки линии MIN6 культивировали в среде следующего состава: 15% сыворотки крупного рогатого скота (FBS, GIBCO), 0,05 мМ β-меркаптоэтанола, 4 мМ L-глутамина, Advanced DMEM (GIBCO). Для выделения тотальной РНК использовали не менее 0,8-1 млн клеток.

Для приготовления клонотек из изолированных моноклонов и образцов островков Лангерганса брали 300-400 нг обработанной ДНКазой РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор SuperScript IV VILO Master Mix, кДНК использовали для проведения ПЦР с геноспецифичными праймерами к генам вкусовых рецепторов и выродженными праймерами к генам ОР [9]. ПЦР продукты клонировали в плазмиду pJET, что позволяет получить в *E. coli* клонотеку, содержащую все виды транскриптов ОР, присутствующих в анализируемой клеточной популяции. Плазмиды, выделенные из индивидуальных клонов клонотеки, секвенировали, тип рецептора идентифицировали с помощью программы BLAST.

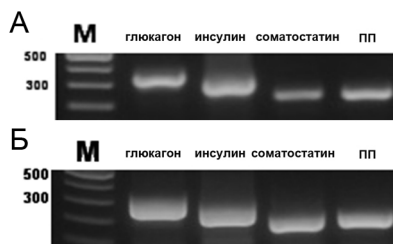
**Результаты.** Качественный анализ продуктов ОТ-ПЦР для генов вкусовых рецепторов *T1R1*, *T1R2*, *T1R3*, *Gnat1*, *Gnat2*, *Gnat3*, *PLC b2* в бета-клетках островков Лангерганса и клетках MIN6 показал, что набор транскриптов генов сигнальных белков в исследованных образцах

отличается. Так, в бета-клетках полностью отсутствует продукт транскрипции гена *T1R2*, обнаруживаемый в MIN6, в то время как для MIN6 не выявляется транскрипт *Gnat3*.

При этом, и в бета-клетках, и в MIN6 выявляются транскрипты маркерных гормонов (глюкагон, инсулин, соматостатин, панкреатический пептид ПП), характерных для панкреатических клеток. Таким образом, клетки MIN6 не в полной мере воспроизводят спектр вкусовых рецепторов, характерный для нативной ткани.



**Рис. 1.** Результаты ОТ-ПЦР для транскриптов генов вкусовых рецепторов А – в клетках вкусовой почки мыши, Б – в клетках островков Лангерганса, В – в клетках MIN6.



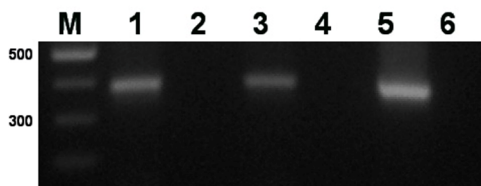
**Рис. 2.** Результаты ОТ-ПЦР для транскриптов генов гормонов А – в клетках MIN6, Б – в клетках островков Лангерганса.

Для детектирования транскриптов ОР был применен подход получения клонотек после ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами к генам ОР [9], позволяющий селективно амплифицировать весь набор

транскриптов этих генов. Углубленный ПЦР с вырожденными праймерами дает гомогенный продукт размером около 400 нп, выявляемый как для обонятельного эпителия (ОЭ), так и для образцов, полученных из клеток островков Лангерганса и MIN6 (рис. 3). Этот продукт был использован для приготовления клонотек. Данные по секвенированию образцов клонотек и определению типа рецепторов представлены в табл. 1.

**Табл. 1.** Представленность транскриптов ОР в образцах клонотек в % по отношению к общему числу проанализированных клонов.

№ OLFR рецептора, Sequence ID	MIN6 смешанная популяция	MIN6 моноклоны			Клетки островков Лангерганса	
		Клонотека 1	Клонотека 2	Клонотека 3	Клонотека 1	Клонотека 2
<b>16</b> NM 008763.2	25%	44%	33%	33%	–	–
<b>55</b> NM 010998.2	5%	–	–	–	–	–
<b>57</b> NM 147041.2	10%	–	–	6.6%	–	–
<b>172</b> NM 147001.2	–	–	20%	6.6%	–	–
<b>173</b> NM 147000.2	–	–	–	6.6%	–	–
<b>412</b> NM 001011851.1	5%	–	10%	13.3%	–	11.1%
<b>455</b> NM 001081301.2	–	–	–	–	11.1%	11.1%
<b>458</b> NM 146444.1	–	–	–	–	11.1%	11.1%
<b>544</b> NM 020289.2	10%	–	10%	20%	11.1%	–
<b>545</b> NM 146840.2	–	–	–	6.6%	–	–
<b>1256</b> NM 146983.1	5%	33%	30%	13.3%	–	–
<b>1273-ps1</b> NR 160690.1	–	–	–	–	11.1%	44.4%
<b>1328</b> NM 146399.2	30%	–	–	–	–	–
<b>1330</b> NM 146334.2	5%	–	–	–	–	–
<b>1347</b> NM 146385.1	5%	–	–	–	–	–
<b>1372-ps1</b> NR 034155.1	–	11%	–	–	11.1%	–
<b>1393</b> NM 146471.1	–	–	–	–	44.4%	11.1%
<b>1440</b> NM 146684.1	–	11%	–	–	–	–



**Рис. 3.** Экспрессия обонятельных рецепторов – ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами: 1-MIN6, 2-отрицательный контроль обратной транскрипции MIN6, 3 – клетки островков Лангерганса, 4 – отрицательный контроль обратной транскрипции, клетки островков Лангерганса, 5-ОЭ, 6 – отрицательный контроль обратной транскрипции, ОЭ.

Секвенирование клонотек как для популяции клеток MIN6, так и для индивидуальных моноклонов выявило воспроизводимую экспрессию *Olfir16*, *Olfir412*, *Olfir544*, *Olfir1256*. При этом, из характерного для MIN6 набора рецепторов в клетках островков Лангерганса обнаруживается только *Olfir412* и *Olfir544*, зато присутствуют транскрипты *Olfir455*, *Olfir458*, *Olfir1393* и продукты, картированные на последовательность псевдогена *Olfir 1273-ps1*.

**Обсуждение.** Несмотря на возрастающий интерес к функциональной специализации обонятельных и вкусовых рецепторов в тканях, контролирующих метаболизм углеводов, и предпринятые попытки идентификации представителей семейства ОР, экспериментальные данные, полученные разными исследовательскими группами, остаются достаточно противоречивыми. Так, методом гибридизации на микроматрицах была продемонстрирована транскрипция 47 ОР [10] в бета-клетках поджелудочной железы и популяции клеток MIN6. Относительный уровень представленности транскриптов значительно варьировал как в ряду изоформ рецепторов для одного типа клеток (диапазон вариаций ~500 раз), так и для одного и того же гена ОР в двух исследованных образцах [10]. В числе 47 генов ОР, экспрессируемых в инсулин-секретирующих клетках, наиболее высокий уровень транскрипции зарегистрирован для *Olfir544* в клетках MIN6, в то время как в бета-клетках его продукция носит умеренный характер. Примечательно, что в нашей работе мРНК этого рецептора детектируется в смешанной популяции MIN6, двух моноклонах и клетках островков Лангерганса, что делает его перспективным кандидатом для исследования физиологической

роли в тканях, обеспечивающих углеводный обмен. Ни один из близких внутривидовых гомологов *Olf544* (*Olf543*, *Olf545*, *Olf544*, *Olf552*, *Olf562*) не выявляется ни в нашей работе, ни в исследовании [10], что говорит об избирательной селекции одного из близких по структуре ОР. Для *Olf544* установлен широкий спектр лигандов, большинство из которых относятся к среднепочечным жирным кислотам (C9-C15) и их производным [11].

Другим заслуживающим внимания представителем семейства ОР по результатам нашей работы является *Olf16*, транскрипт которого обнаруживается как в смешанной популяции MIN6, так в отдельных моноклонах, но отсутствует в двух проанализированных клонотеках из клеток островков. Ранее экспрессия *Olf16* была показана для ткани венозного эндотелия, аорты и коронарной артерии [12]. В гепатоцитах человека инактивация *Olf16* с использованием siРНК приводит к жировой инфильтрации, что косвенно указывает на вовлеченность данного рецептора в регуляцию липолиза [13]. Лигандами *Olf16* являются терпеноподобные соединения альфа-цедрен (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> – сесквитерпен), компонент кедрового и можжевельного масел, и эфирные масла цветов ландыша. Для гепатоцитов показано стимулирующее действие цедрена на снижение аккумуляции липидов, опосредованное *Olf16* и реализуемое с участием цАМФ-зависимого сигнального пути. Физиологическая роль *Olf16* в инсулин-секретирующих клетках неясна. Универсальный характер ответа на стимуляцию рецептора, приводящего к активации цАМФ-зависимой протеинкиназы, допускает возможность воздействия лигандов этого рецептора на различные клетки, связанные как с утилизацией метаболитов, так и с секреторными функциями. Отсутствие транскрипта, соответствующего гену *Olf16*, в образцах двух независимо полученных клонотек бета-клеток может быть связано с устойчивым изменением профиля экспрессии данного гена при получении клеточной линии MIN6, что представляет интерес с точки зрения участия ОР в «перепрограммировании» клеток при их изоляции из естественного тканевого окружения.

Мы ожидали, что спектр экспрессируемых хеморецепторов в клетках островков Лангерганса и их имитационной модели – клетках инсулиномы MIN6 окажутся схожими, как по составу детектируемых транскриптов, так и по их количественным соотношениям. Однако, за исключением вкусовых рецепторов T1R1, T1R3, Gnat1, Gnat2, PLC b2 и обонятельных *Olf544* и *Olf412*, продукты транскрипции которых присутствуют во всех образцах, клетки нативной ткани и их культивируемые производные обладают разными паттернами представленности транскриптов. Следует отметить, что наиболее

репрезентативные для клеток островков и/или MIN6 ОР (Olf1544, Olf1412, Olf116, Olf1393) не являются «лидерами» по уровню экспрессии в клетках обонятельного эпителия, демонстрируя умеренный уровень транскриптов [14]. Это указывает на детерминированный характер их селективной активации в исследованных типах клеток. Транскрипт *Olf16* обнаруживается только в MIN6, в то время как *Olf1393* выявляется только в клетках островков. Экспрессия *Olf1393* была подтверждена и в [10] с преваляцией соответствующего транскрипта в бета-клетках в 4 раза по сравнению с MIN6. В этом отношении и наши, и литературные данные свидетельствуют о различном физиологическом статусе клеток органного происхождения и их культивируемых аналогов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 22-24-00860.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова М.Ф., Колесников С.С. // Успехи физиологических наук. 2020. 51(3): 3-15.
2. Hanchate N.K., Kondoh K., Lu Z. et al. // Science. 2015. 350(6265): 1251-5.
3. Scholz P., Kalbe B., Jansen F. et al. // Chem. Senses. 2016. 41: 313-23.
4. Spehr M., Gisselmann G., Poplawski A. et al. // Science. 2003. 299: 2054-8.
5. Otaki J.M., Yamamoto H., Firestein S.J. // J. Neurobiol. 2004. 58 (3): 315-27.
6. Flegel C., Manteniots S., Osthold S. et al. // PLoS One. 2013. 8: e55368.
7. Chung C., Cho H.J., Lee C., Koo J. // BMB Rep. 2022. 55(2): 72-80.
8. Drew L. // Nature. 2022. 606(7915): S14-7.
9. Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L.B. // Cell. 1999. 96: 713-23.
10. Munakata Y., Yamada T., Imai J. et al. // Sci. Rep. 2018. 8: 1499.
11. Bavan S., Sherman B., Luetje C.W., Abaffy T. // PLoS ONE. 2014. 9(3): e92064.
12. Kim S.H., Yoon C.Y., Lee S.A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. 460: 404-8.
13. Tong T., Ryu E.S., Min Y. et al. // Sci. Rep. 2017. 7: 9471.
14. Ibarra-Soria X., Ibarra-Soria X., Levitin M.O. et al. // PLoS Genet. 2014. 10(9): e1004593.

# ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ЭКСПРЕССИЯ МИОКАРДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ БАРИАТРИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ – ПРОДОЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ ЖЕЛУДКА

*Корнюшин О.В.<sup>1</sup>, Деркач К.В.<sup>2</sup>, Бахтюков А.А.<sup>2</sup>, Сонин Д.Л.<sup>1,3</sup>,  
Казантаева М.<sup>1,4</sup>, Капустина П.А.<sup>1,3</sup>, Шпаков А.О.<sup>2,5</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.  
Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный  
медицинский университет им акад. И.П. Павлова»,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный  
университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный  
университет, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** В настоящее время бариатрические операции (БО), в том числе продольная резекция желудка (ПРЖ), широко применяются для лечения ожирения и сопутствующих ему патологий [1]. В основе их терапевтического эффекта лежит как уменьшение количества жировой ткани, так и изменение инкретинового статуса и чувствительности тканей к инсулину и лептину. Имеются данные о положительном влиянии БО на функции сердечно-сосудистой системы, нарушенные при сахарном диабете и метаболическом синдроме. Однако механизмы такого влияния до конца не выяснены. Полагают, что основную роль здесь играет восстанавливающий эффект БО на энергетический обмен и лептиновую и инсулиновую чувствительность. Нельзя исключить прямого воздействия БО на функции миокарда, которое может реализовываться через специфичные механизмы, вовлеченные в регуляцию фундаментальных клеточных механизмов в кардиомиоцитах, фибробластах и эндотелиальных клетках. Ранее нами было показано, что БО ослабляют кардиоваскулярные дисфункции при метаболических расстройствах без ожирения [2]. Кроме того, имеются данные, что ПРЖ улучшает диастолическую функцию миокарда независимо от потери веса у крыс с моделью ожирения и хронической сердечной недостаточности (ХСН) с сохранённой фракцией выброса с благоприятными изменениями в экспрессии миокардиальных генов, связанных с ХСН, включая кальциевую АТФазу (АТР2А2) [3]. При этом остается невыясненным, как

изменяется гормональный и инкретиновый статус и экспрессия миокардиальных генов, вовлеченных в патогенез ХСН, при постинфарктной ХСН без ожирения. Целью работы было изучить влияние ПРЖ на уровни инсулина, лептина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и грелина в крови и на экспрессию маркеров миокардиальной дисфункции у крыс с постинфарктной ХСН в сравнении с ложнооперированными (ЛО) животными (постинфарктная ХСН+лапаротомия) и крысами с постинфарктной ХСН без лапаротомии.

**Методика.** В экспериментах использовали самцов крыс Wistar SPF категории (Пушино, Россия) с массой тела 260-300 г. Животные находились на стандартной диете, со свободным доступом к пище и воде, в световом режиме 12 ч (день)/12 ч (ночь). Все процедуры при работе с животными осуществляли в соответствии с «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (НИН № 85–23, редакция 2011 г.) и «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes», руководствуясь протоколом, одобренным Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова. Для моделирования у крыс постинфарктной ХСН, в условиях ингаляционного наркоза (изофлуран) и искусственной вентиляции лёгких выполнялась левосторонняя торакотомия в четвёртом межреберье и перманентная перевязка левой коронарной артерии (ЛКА). Верификация ишемии производилась по электро- и эхокардиографическим критериям в момент окклюзии ЛКА, через три дня после операции, а также в конце исследования. Через 11 недель после моделирования ХСН крыс рандомизировали на 4 группы: контроль (интактные крысы), ХСН без операций, ХСН с ПРЖ и ЛО-крысы с ХСН. При проведении ПРЖ за 12 ч до операции крыс ограничивали в приеме пищи с сохранением доступа к воде. ПРЖ выполняли под изофлюрановым наркозом, как описано ранее [2]. После срединной лапаротомии удаляли около 70% желудка с формированием оставшейся части в виде трубки. Желудок ушивался с помощью наложения двухрядного непрерывного шва (Prolene 6-0; Ethicon, США). Группе с ЛО выполняли срединную лапаротомию. Брюшная полость ушивалась послойно непрерывным атравматическим швом (Prolene 4-0; Ethicon, США). В течение 12 ч послеоперационного периода крыс ограничивали в приеме жидкости, компенсируя ее недостаток подкожным введением 8-10 мл физиологического раствора. После возобновления перорального питания в течение 3 дней все животные получали жидкое адаптированное питание, после чего переводились на стандартную диету. Оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ) проводили через 5 недель в четырёх группах крыс (по 6 крыс) после выполнения ПРЖ или ЛО.



При проведении ОГТТ с помощью зонда крысам вводили раствор глюкозы из расчета 2 г глюкозы на кг массы тела и забирали кровь до и через 30, 60, 90 и 120 мин после нагрузки для оценки уровней глюкозы, гормонов и инкретинов [2]. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски «One-Touch Select Ultra» (США), для определения концентраций инсулина, лептина, ГПП-1 и грелина в крови использовали ИФА-наборы «Rat Insulin ELISA» (MercoDia AB, Швеция), «ELISA Kit for Leptin (Rat)», «ELISA Kit for GLP-1 (Rat)» и «ELISA kit for Ghrelin (Rat)» (Cloud-Clone Corp., США), соответственно.

Гистологические препараты миокарда окрашивали по Маллори для морфометрического анализа площади рубцовой ткани, а также для оценки выраженности фиброза и гипертрофии миокарда, выраженность которой оценивали по макро- и микроскопическим критериям.

Для проведения ПЦР из миокарда выделяли тотальную РНК с помощью реагента «ExtraRNA», обратную транскрипцию проводили с помощью «MMLV RT Kit» (Евроген, Россия) [4]. Сигнал оценивали, используя амплификатор «7500 Real-Time PCR System» (Thermo Fisher Scientific Inc., США). В качестве референсных использовали гены 18S-рРНК (*18S rRNA*) и  $\beta$ -актина (*Actb*). Показатели экспрессии анализировали методом ДДС, и значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе, принимая их за 1.0. Для оценки экспрессии генов, кодирующих транзиторные рецепторные катионные каналы TRPC3 и TRPC6, трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) и кальциевую АТФазу 2 типа (ATP2A2), использовали следующие праймеры:

*Trpc3* – TGGAAC TGGGCATGGGTAAC (For)  
и TGCTGATATCGTGTGGCTGA (Rev);  
*Trpc6* – GAGGATGATGCGGATGTGGAG (For)  
и AGCAGGGACTTTGGACTTGG (Rev);  
*Tgfb1* – GACTCTCCACCTGCAAGACC (For)  
и GGACTGGCGAGCCTTAGTTT (Rev);  
*Atp2a2* – TTTGTGGCCCCGAAACTACCT (For)  
и AGCTGGGGGCTGTTCTATTTTC (Rev).

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ «SPSS Statistics», применяя однофакторный дисперсионный анализ с попарным сравнением с помощью критерия Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Тесты по оценке функционального состояния миокарда показали, что ПРЖ, не ухудшая сократительную активность миокарда (данные не представлены), демонстрировала тенденцию к улучшению ряда показателей по переносимости физической нагрузки в тредмил-тесте у крыс с постинфарктной ХСН. Тем самым, получены свидетельства в пользу потенциального кардиопротекторного эффекта ПРЖ при ХСН.

В группе ХСН в сравнении с контролем отмечали повышение уровня глюкозы в ОГТТ через 120 мин после нагрузки (табл. 1), но базовые уровни глюкозы и интегрированные значения для уровня глюкозы в течение ОГТТ ( $AUC_{0-120}$ ) не превышали таковые в контроле. Во всех группах отмечали повышение выброса инсулина через 60 мин после нагрузки, причем в группах ХСН и ХСН-ЛО подъем уровня инсулина был ниже, чем в группе ХСН-ПРЖ, что указывает на потенцирующее влияние ПРЖ на стимулированную глюкозой секрецию инсулина. Через 120 мин уровни инсулина во всех группах были сходными (табл. 1).

**Табл. 1.** Уровни глюкозы, инсулина, лептина, ГПП-1 и грелина в крови крыс с ХСН при проведении ОГТТ, и влияние на эти показатели ПРЖ.

Показатель	Контроль	ХСН	ХСН-ЛО	ХСН-ПРЖ
<b>Глюкоза, мМ</b>				
0	4.07±0.15	3.83±0.14	3.95±0.21	3.83±0.18
120	6.03±0.29 <sup>a</sup>	7.42±0.32 <sup>a,b</sup>	7.10±0.40 <sup>a</sup>	6.95±0.32 <sup>a</sup>
<b>Инсулин, нг/мл</b>				
0	0.44±0.06	0.51±0.08	0.54±0.08	0.43±0.05
60	1.25±0.22 <sup>a</sup>	1.04±0.20 <sup>a</sup>	1.01±0.21 <sup>a</sup>	1.73±0.76 <sup>a</sup>
120	0.55±0.12	0.63±0.10	0.56±0.09	0.49±0.06
<b>Лептин, нг/мл</b>				
0	3.19±0.73	4.55±0.98	4.80±0.67	3.55±0.26
120	6.42±1.04	10.32±1.80 <sup>a</sup>	9.58±1.40 <sup>a</sup>	6.33±0.57 <sup>a,c,d</sup>
<b>Глюкагоноподобный пептид-1, пг/мл</b>				
0	32.80±3.67	26.34±1.44	27.62±1.56	31.63±1.77 <sup>c</sup>
30	55.37±4.30 <sup>a</sup>	35.13±2.43 <sup>a,b</sup>	41.58±2.85 <sup>a,b</sup>	50.44±3.22 <sup>a,c</sup>
<b>Грелин, пг/мл</b>				
0	450.4±67.6	652.3±117.8	669.5±116.7	497.2±86.8
60	244.5±28.4	504.3±70.9 <sup>b</sup>	494.0±89.2 <sup>b</sup>	266.5±43.2 <sup>a,c,d</sup>

**Примечание:** различия статистически значимы при  $p < 0.05$ : <sup>a</sup> – при сравнении с базовым значением показателя (точка «0»), <sup>b</sup> – при сравнении с Контролем, <sup>c</sup> – между группами ХСН и ХСН-ПРЖ, <sup>d</sup> – между группами ХСН-ЛО и ХСН-ПРЖ. Значения представлены, как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Через 120 мин отмечали значимое повышение уровня лептина во всех группах с ХСН, но в группе ХСН-ПРЖ это повышение было выражено слабее, на что указывает значимое снижение концентрации этого адипокина в группе ХСН-ПРЖ в сравнении с ХСН и ХСН-ЛО (табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о более выраженном и устойчивом во времени повышении уровня лептина, стимулированного глюкозной нагрузкой, в крови крыс с ХСН и снижающем его эффекте ПРЖ. Через 30 мин после введения глюкозы во всех группах отмечали повышение уровня ГПП-1, но оно различалось по величине (табл. 1). По

сравнению с базовым уровнем ГПП-1, у контрольных крыс повышение уровня ГПП-1 составило 69%, в группах ХСН и ХСН-ЛО – 33 и 51%, в группе ХСН-ПРЖ – 59%. Более того, концентрация ГПП-1 через 30 мин после нагрузки в группе ХСН была значимо ниже, чем в контрольной группе и ХСН-ПРЖ, что указывает на ослабление секреции ГПП-1 в условиях ХСН и на восстанавливающий ее эффект ПРЖ (табл. 1). В группах ХСН и ХСН-ЛО отмечали тенденцию к повышению базового уровня грелина и значимое повышение уровня грелина через 60 мин после глюкозной нагрузки, а также нормализацию уровня грелина после ПРЖ (табл. 1). Это может быть обусловлено тем, что при ПРЖ удаляется грелин-продуцирующая зона желудка и продукция грелина снижается. В группе ХСН-ПРЖ, для которой характерно частичное восстановление функций миокарда, уровень грелина возвращался к норме. Можно полагать, что длительная ХСН, без ее частичной компенсации после ПРЖ, приводит к длительной гипергрелинемии и, как следствие, к резистентности тканей к грелину, и в этом случае повышение уровня грелина в группах ХСН и ХСН-ЛО может быть результатом такой резистентности. Сходная ситуация может наблюдаться и для лептина, уровень которого повышен в группах крыс с ХСН без ПРЖ (табл. 1).

Оценка экспрессии генов в миокарде крыс показала, что в группах ХСН и ХСН-ЛО экспрессия всех изученных генов была повышена в сравнении с группой Контроль, в большей степени для генов *Trpc6* и *Atp2a2*, в меньшей степени – для генов *Trpc3* и *Tgfb1* (табл. 2).

**Табл. 2.** Экспрессия генов, кодирующих TRPC3, TRPC6, TGFβ1 и ATP2A2, в миокарде крыс с ХСН, и влияние на нее ПРЖ.

Ген	Контроль	ХСН	ХСН-ЛО	ХСН-ПРЖ
<i>Trpc3</i>	0.99±0.07	1.47±0.12 <sup>a</sup>	1.73±0.29 <sup>a</sup>	1.45±0.20
<i>Trpc6</i>	1.03±0.13	2.31±0.22 <sup>a</sup>	2.66±0.37 <sup>a</sup>	0.71±0.08 <sup>b,c</sup>
<i>Tgfb1</i>	1.01±0.05	1.46±0.07 <sup>a</sup>	1.39±0.13 <sup>a</sup>	0.76±0.05 <sup>a,b,c</sup>
<i>Atp2a2</i>	1.00±0.14	1.81±0.31 <sup>a</sup>	2.69±0.36 <sup>a</sup>	2.08±0.44 <sup>a</sup>

**Примечание:** Значения представлены как RQ в относительных единицах, за 1.0 условно приняты значения этого показателя в контрольной группе. <sup>a</sup> – при сравнении с Контролем, <sup>b</sup> – между группами ХСН и ХСН-ПРЖ, <sup>c</sup> – между группами ХСН-ЛО и ХСН-ПРЖ. Значения представлены, как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

ПРЖ приводила к нормализации экспрессии генов *Trpc6* и *Tgfb1*, но не влияла на экспрессию генов *Trpc3* и *Atp2a2*. Имеются данные, что повышенная экспрессия TRPC6 ассоциирована с кальций-индуцируемым апоптозом кардиомиоцитов, вызванным инфарктом миокарда, а также вовлечена в процессы гипертрофии левого желудочка при кардиомиопатии [5]. TGFβ1, в свою очередь, вовлечен в процессы

кардиосклероза и кардиовоспаления в постинфарктный период, причем на ранних стадиях постинфарктного периода он может защищать кардиомиоциты от повреждения провоспалительными цитокинами, в то время как в более отдаленные сроки TGFβ1 способствует фиброзу и гипертрофии [6]. Вследствие этого нормализация экспрессии генов *Trpc6* и *Tgfb1* может быть вовлечена в кардиопротекторный эффект ПРЖ, ослабляющий негативные последствия инфаркта миокарда и, тем самым, предотвращающий запуск TRPC6- и TGFβ1-опосредуемых каскадов, ассоциированных с постинфарктным кардиосклерозом и кардиовоспалением. Экспрессия кальциевой АТФазы АТР2А2 при инфаркте снижается, но в дальнейшем наблюдается компенсаторное повышение экспрессии и активности этого фермента [7]. Нами во всех группах с ХСН, включая ХСН-ПРЖ, продемонстрирован высокий уровень экспрессии гена *Atp2a2*, что может указывать на устойчивость во времени компенсаторного повышения экспрессии этого фермента, без заметного влияния на нее ПРЖ.

Таким образом, впервые показано, что у крыс с ХСН проведение ПРЖ снижает стимулированные глюкозой уровни инсулина, лептина и грелина до их уровня в контроле и восстанавливает сниженные при ХСН уровни ГПП-1, что указывает на вызываемую ПРЖ нормализацию гормонального статуса при ХСН. Наряду с этим, ПРЖ снижает повышенную при ХСН экспрессию миокардиальных генов *Trpc6* и *Tgfb1*, вовлеченных в патогенез инфаркта миокарда, что может указывать в пользу снижения негативных последствий миокардиальной ишемии у животных, перенесших ПРЖ. Эти данные поддерживают концепцию о кардиопротекторном потенциале ПРЖ при ХСН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gupta M., Singla V., Kumar A. et al. // *Obes. Surg.* 2022. 32: 2744-52.
2. Korniyushin O., Sonin D., Polozov A. et al. // *Sci. Rep.* 2021. 11: 23888.
3. Hayes H., Patz J., Corbett J. et al. // *Surg. Obes. Relat. Dis.* 2019. 15: 837-42.
4. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. 21: 7493.
5. Ramez M., Rajabi H., Ramezani F. et al. // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2019. 19: 118.
6. Wang L., Zhang Y., Yu M., Yuan W. // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2022. 9: 409.
7. Chen J., Liu Y., Pan D. et al. // *Cell. Commun. Signal.* 2022. 20: 38.

# БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ САМЦОВ И САМОК КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

*Корф Е.А.<sup>1</sup>, Новожилов А.В.<sup>1</sup>, Воронина П.А.<sup>1</sup>, Войтенко Н.Г.<sup>1</sup>,  
Ганем А.<sup>1,2</sup>, Хабиб С.<sup>2</sup>, Гончаров Н.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Пероксид водорода (ПВ) – одна из наиболее стабильных активных форм кислорода (АФК) [1]. В высоких концентрациях ПВ, как и другие АФК, оказывает повреждающее действие, однако в умеренных концентрациях выполняет сигнальные функции в редокс-чувствительных сигнальных путях [2]. Характер воздействия ПВ на клетку зависит от его внутриклеточной концентрации. Регуляторная активность ПВ проявляется при концентрации его в клетке до 0.7 мкМ, при повышении внутриклеточной концентрации до 10 мкМ ПВ вызывает оксидативный стресс, а при дальнейшем повышении концентрации запускаются механизмы гибели клеток [3-6]. ПВ играет важную роль в клеточной пролиферации [7,8], дифференцировке [9], миграции [10] и апоптозе [11]. Оксидативный стресс является неотъемлемой частью любого стресса, в то же время остается неизвестным влияние экзогенных прооксидантов и собственно пероксида водорода на динамику стресс-реакции. Цель настоящей работы – изучение краткосрочных эффектов введения сублетальных доз ПВ на биохимические показатели плазмы крови самок крыс линии Wistar.

**Материалы и методы.** Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Объектом исследования являлись аутбредные крысы линии Wistar (самцы и самки) 3-месячного возраста, массой 280-320 г (самцы) и 220-260 г (самки). Крысы содержались в стандартных условиях вивария с режимом светового дня 12:12, за 12 ч до эксперимента животных лишали пищи при свободном доступе к воде. Крыс разделяли на 3 группы: контроль (n = 6), 5 мин (n = 7) и 20 мин (n = 8) после введения ПВ. 3%-й водный раствор ПВ (15 мг/мл) вводили внутрибрюшинно (в/б) в объеме 5 мл/кг, т.е. вводимая доза составила 75 мг/кг. Контрольной группе вводили аналогичный объем

воды. Через 5 и 20 мин проводили декапитацию животных посредством гильотины. Кровь собирали в пробирки с гепарином в физрастворе до конечной концентрации гепарина 50 МЕ/мл. Для получения плазмы кровь центрифугировали 4 мин при 1700 g, плазму хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Биохимический анализ плазмы выполняли на биохимическом анализаторе Sapphire 400 с использованием коммерческих наборов RANDOX. Базу данных создавали с помощью электронного пакета Microsoft Office Excel 2012. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ STATISTICA 12.0 и PAST. Вид распределения признака определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределения оказались отличными от нормального, применяли непараметрические методы анализа: результаты представлены в виде медианы, минимума и максимума в абсолютных значениях. Для сравнения трех независимых групп по количественному признаку использовали метод Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты.** У самок крыс (табл. 1) концентрация глюкозы в плазме крови через 5 мин после введения ПВ повышена на 25%, концентрация лактата через 20 мин снижена на 38% относительно контрольной группы и на 34.3% относительно группы 5 мин. Следовательно, в первые минуты после введения ПВ имеет место активация углеводного обмена, что может быть связано с повышением уровня гормонов стресса (адреналина, кортизола), в том числе в ответ на фиксацию животного для введения любого препарата. Также через 5 мин после введения ПВ незначительно (на 2%), однако статистически значимо ( $p < 0.01$ ) повышается активность щелочной фосфатазы. Спустя 5 и 20 мин отмечено снижение концентрации трансферрина на 6%, сопоставимо снижается на 5.5% ОЖСС. Трансферрин – отрицательный острофазный белок, его уровень снижается при воспалении и при стрессе при активации глюконеогенеза в печени за счет распада белка и/или снижении его синтеза. Об этом свидетельствует снижение через 5 и 20 мин концентрации общего белка плазмы примерно на 7%, а также снижение концентрации альбумина на 4.3%. Кроме того, косвенно о распаде белка в мышцах свидетельствует повышение концентрации креатинина на 10.7% спустя 20 мин после введения ПВ – как по отношению к контрольной группе, так и по отношению к группе 5 мин. Однако максимальные изменения отмечены в уровне НЭЖК – повышение в 3.2 раза спустя 20 мин после введения ПВ; усиление липолиза также является частью стресс-реакции организма.

**Табл. 1.** Результаты биохимического анализа показателей плазмы крови самок крыс. Результаты представлены в виде медиан (min; max). \* – достоверность отличия от контрольной группы  $p < 0.05$ ; \*\* – достоверность отличия от контрольной группы  $p < 0.01$ ; <sup>Δ</sup> – достоверность отличия от группы ПВ 5 мин  $p < 0.05$ ; <sup>ΔΔ</sup> – достоверность отличия от группы ПВ 5 мин  $p < 0.01$ .

Группа (n) / Показатель	Контроль (n = 6)	ПВ 5 мин (n = 7)	ПВ 20 мин (n = 8)
АЛТ, ед/л	72.2 (62.9; 96.7)	73.2 (54.3; 94.9)	74.6 (59.0; 93.4)
Альбумин, г/л	30.4 (29.9; 33.1)	29.1 (26.5; 31.3) *	29.1 (27.3; 31.3) *
ЩФ, ед/л	180.3 (178.0; 181.5)	184.0 (181.0; 196.5) **	181.5 (176.5; 190.0)
Глюкоза, ммоль/л	6.4 (5.6; 7.5)	8.0 (6.9; 9.3) **	6.9 (6.2; 9.9)
Трансферрин, г/л	1.12 (1.10; 1.38)	1.06 (0.89; 1.47) *	1.06 (0.91; 1.15) *
Общий белок, г/л	78.0 (75.0; 82.0)	72.5 (65.1; 77.3) *	72.7 (68.8; 77.7) **
Fe, мкмоль/л	22.7 (11.7; 27.6)	26.1 (17.6; 32.9)	25.7 (18.0; 36.3)
Phos, ммоль/л	1.5 (1.3; 1.9)	1.7 (1.1; 2.5)	1.6 (1.1; 1.8)
Mg, ммоль/л	0.52 (0.49; 0.54)	0.48 (0.42; 0.54)	0.50 (0.42; 0.59)
K, ммоль/л	4.8 (4.7; 5.1)	4.8 (4.5; 5.3)	4.8 (4.4; 5.0)
Мочевина, ммоль/л	8.7 (7.3; 9.8)	8.4 (6.7; 10.1)	8.7 (8.0; 9.4)
Триглицериды, ммоль/л	0.64 (0.48; 0.71)	0.55 (0.37; 0.58)	0.52 (0.43; 0.68)
Креатинин, мкмоль/л	56 (53; 62)	56 (53; 60)	62 (58; 70) * <sup>ΔΔ</sup>
Желчные кислоты, мкмоль/л	10.7 (7.3; 11.0)	11.4 (7.8; 24.4)	9.4 (7.3; 18.0)
Холестерол, ммоль/л	1.23 (1.14; 1.73)	1.12 (0.93; 1.48)	1.15 (0.84; 1.37)
ЛПВП, ммоль/л	0.51 (0.50; 0.75)	0.52 (0.45; 0.69)	0.55 (0.40; 0.64)
ЛПНП, ммоль/л	0.39 (0.31; 0.47)	0.32 (0.25; 0.42)	0.30 (0.23; 0.44)
НЭЖК, ммоль/л	0.38 (0.15; 1.38)	0.31 (0.15; 6.58)	1.22 (0.46; 1.99) *
Мочевая кислота, мкмоль/л	81 (40; 96)	59 (40; 97)	72 (51; 114)
Лактат, ммоль/л	3.7 (2.5; 5.2)	3.5 (2.6; 5.4)	2.3 (1.5; 3.6) * <sup>Δ</sup>
ОЖСС, мкмоль/л	25.5 (25.0; 31.4)	24.1 (20.3; 33.4) *	24.1 (20.7; 26.2) *

У самцов крыс (табл. 2) биохимический профиль в ответ на введение ПВ в целом более выражен по сравнению с самками, с акцентом на изменения углеводного и липидного обмена, тогда как белковый обмен затронут в меньшей степени. Так, спустя 5 и 20 мин отмечено повышение концентрации глюкозы в 1.4 раза ( $p < 0.01$ ). Уровень триглицеридов через 5 мин понижен в 1.7 раз, притом что концентрация свободных жирных кислот повышается в 3.6 раза через 20 мин. Также отмечено снижение на 17-18% концентрации холестерина и на 20% липопротеинов низкой плотности через 5 и 20 мин. Спустя 20 мин снижается на 4.3% уровень общего белка, на 17% – липопротеинов высокой плотности и на 36% – желчных кислот. Последнее может быть связано с частичным перекрытием желчных протоков, о чем также свидетельствует снижение на 7% активности щелочных фосфатаз. Повышение через 20 мин после введения ПВ концентрации креатинина (на 30% и на 23% относительно контроля и группы 5 мин) и мочевины (примерно на четверть) свидетельствует об уменьшении почечного кровотока. Концентрация

мочевой кислоты спустя 20 мин после введения ПВ повышается как относительно контрольной группы (в 1.6 раз), так и относительно группы 5 мин (в 1.3 раза). Выявлено снижение концентрации кальция на 4.8% и 7.4% через 5 и 20 мин и повышение на 40% концентрации железа.

**Табл. 2.** Результаты биохимического анализа показателей плазмы крови самцов крыс. Результаты представлены в виде медиан (min; max). \* – достоверность отличия от контрольной группы  $p < 0.05$ ; \*\* – достоверность отличия от контрольной группы  $p < 0.01$ ; <sup>Δ</sup> – достоверность отличия от группы ПВ 5 мин  $p < 0.05$ ; <sup>ΔΔ</sup> – достоверность отличия от группы ПВ 5 мин  $p < 0.01$ .

Группа (n) / Показатель	Контроль (n = 6)	ПВ 5 мин (n = 6)	ПВ 20 мин (n = 8)
АЛТ, ед/л	95.5 (70.5; 251.1)	106.0 (75.3; 214.9)	105.1 (86.1; 140.7)
Альбумин, г/л	31.6 (30.4; 33.0)	30.6 (30.0; 32.1)	29.4 (28.1; 31.9)
ЩФ, ед/л	257 (249; 263)	234 (220; 268)	239 (216; 266) *
Глюкоза, ммоль/л	6.6 (5.8; 7.0)	9.3 (7.9; 9.6) **	9.3 (7.8; 12.0) **
Трансферрин, г/л	1.29 (1.23; 1.54)	1.25 (1.24; 1.40)	1.21 (1.11; 1.60)
Общий белок, г/л	73.9 (72.2; 76.2)	71.7 (70.0; 73.9)	70.7 (65.2; 72.8) **
Fe, мкмоль/л	31.5 (23.8; 53.3)	35.4 (30.3; 36.6)	44.0 (32.3; 49.6) *
Phos, ммоль/л	2.6 (2.4; 2.9)	2.5 (2.0; 2.8)	2.6 (2.4; 3.3)
Mg, ммоль/л	0.57 (0.55; 0.61)	0.56 (0.52; 0.58)	0.55 (0.53; 0.62)
K, ммоль/л	7.2 (5.7; 7.4)	6.6 (5.2; 7.7)	6.1 (5.5; 7.1)
Cl, ммоль/л	102 (99; 108)	102 (100; 106)	102 (99; 104)
Ca, ммоль/л	2.72 (2.63; 2.75)	2.59 (2.52; 2.66) *	2.52 (2.45; 2.66) **
Мочевина, ммоль/л	12.6 (10.9; 16.7)	15.3 (12.3; 16.5)	15.8 (12.5; 21.1) *
Триглицериды, ммоль/л	0.64 (0.53; 0.89)	0.37 (0.35; 0.52) **	0.57 (0.33; 0.95)
Креатинин, мкмоль/л	50 (46; 53)	53 (49; 57)	65 (61; 72) ** <sup>ΔΔ</sup>
Желчные кислоты, мкмоль/л	17.7 (12.9; 28.2)	20.7 (7.7; 33.0)	11.3 (8.6; 25.4) *
Холестерол, ммоль/л	1.41 (1.17; 1.65)	1.17 (1.09; 1.36) *	1.15 (0.82; 1.23) **
ЛПВП, ммоль/л	0.95 (0.79; 1.25)	0.75 (0.54; 0.95)	0.79 (0.55; 0.92) *
ЛПНП, ммоль/л	1.52 (1.32; 2.10)	1.21 (0.75; 1.44) *	1.20 (0.84; 1.34) **
НЭЖК, ммоль/л	0.33 (0.25; 0.54)	0.24 (0.16; 0.32)	1.20 (0.12; 0.29) *
Мочевая кислота, мкмоль/л	37 (30; 51)	47 (34; 50)	61 (43; 107) * <sup>Δ</sup>
Лактат, ммоль/л	3.7 (1.5; 5.7)	3.7 (2.4; 4.1)	3.2 (2.4; 5.4)
ОЖСС, мкмоль/л	29.4 (28.0; 37.1)	28.3 (28.2; 31.9)	27.4 (25.3; 36.4)

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

- Надеев А.Д., Зинченко В.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. // Токсикологический вестник. 2014. 2(125): 22-7.
- Petry A., Weitnauer M., Görlach A. // Antioxid. Redox Signal. 2010. 13(4): 467-87.
- Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воронников А.В. // Биологические мембраны. 2012. 29(1-2): 21-37.



4. Forman H.J., Maiorino M., Ursini F. // *Biochemistry*. 2010. 49(5): 835-42.
5. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R. et al. // *Cell Communication and Signaling*. 2015. 13(1): 1-19.
6. Stone J.R., Yang S. // *Antioxidants & redox signaling*. 2006. 8(3-4): 243-70.
7. Geiszt M., Leto T.L. // *J. Biol. Chem.* 2004. 279: 51715-8.
8. Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И. и др. // *Биофизика*. 2010. 55: 1048-56.
9. Li J., Stouffs M., Serrander L. et al. // *Mol. Biol. Cell*. 2006. 17: 3978-88.
10. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase derived ROS. *Sci. STKE*. 2006;re8.
11. Cai H. // *Cardiovasc. Res*. 2005. 68: 26-36.

## ВЛИЯНИЕ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МОЗГА ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ НА ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

*Крамарова Л.И.<sup>1</sup>, Зиганишин Р.Х.<sup>2</sup>, Михайлова Г.З.<sup>1</sup>,  
Утешев В.К.<sup>3</sup>, Гахова Э.Н.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

**Введение.** Поиск веществ и механизмов, регулирующих адаптацию животных и человека к переживанию неблагоприятных условий, в частности, к холоду, отсутствию воды и пищи в течение продолжительного периода, является одним из приоритетных направлений в области современной медицины и биологии [1-3]. Зимняя спячка (гибернация) является природной моделью устойчивости и выживания в экстремальных условиях некоторых видов млекопитающих и птиц. В многочисленных работах было показано, что в состоянии гибернации организм защищен не только от действия низких температур, но также от ишемии, болезней мышц и их атрофии, различных инфекций, онкологических заболеваний и даже от действия радиации [4-6]. Это состояние характеризуется глубоким и хорошо контролируемым подавлением метаболизма, температуры тела, скорости сердечных сокращений и других физиологических функций животных. На протяжении последних четырех десятилетий исследователями в разных странах были предприняты попытки выделения и идентификации

факторов из различных тканей зимоспящих животных, которые могли бы у теплокровных животных индуцировать эффекты, специфичные для состояния зимней спячки. Конечной целью данных исследований является создание регулируемого, естественного гипобиоза у животных и человека [1,2,7].

В начале 80-х годов прошлого столетия появились доказательства того, что некоторые из известных пептидов ( $\beta$ -эндорфин, Met-энкефалин, динорфин, DAGO, DADLE, холицистокенин, соматостатин, бомбезин, нейротензин, вазопрессин, пептид дельта-сна, тиролиберин, киоторфин, неокиоторфин и др.) могут быть физиологически значимы для процесса зимней спячки. Помимо этого, вероятно, существуют специфичные, но все еще неизвестные пептиды и факторы не пептидной природы, которые являются природными регуляторами этого феномена [4].

В 1995 году совместно с болгарскими и швейцарскими коллегами мы показали, что в гипометаболической фракции бурого жира с молекулярной массой (1-10 кДа) одним из активных компонентов является 5'-аденозинмонофосфат (5'-АМФ), который оказывает ингибирующее влияние на активированную митогенами пролиферацию лимфоцитов мышей [8]. Далее, в 1999 году были представлены данные о повышенном содержании 5'-АМФ и 5'-ГМФ в мозге зимоспящих животных в состоянии спячки [9]. Также были продемонстрированы кардиотропные эффекты 5'-АМФ в различных концентрациях на изолированном сердце лягушки (*Rana temporaria*), в частности, данный нуклеотид ингибировал как частоту сердечных сокращений, так и снижал их силу [9].

При вхождении в зимнюю спячку и выходе из этого состояния изменения ритма сердечбиений предшествует изменению уровня общего окислительного метаболизма и температуры [10]. Следовательно, поиск эндогенных веществ, вовлеченных в регуляцию сердечных ритмов, является одним из наиболее важных этапов в поиске регуляторов сезонных состояний гетеротермных животных.

Использование развивающихся куриных эмбрионов, как тест-системы для исследования биологических эффектов различных веществ, имеет свои преимущества из-за большой поверхности бластодермы и, следовательно, большей возможности контакта с тестируемыми веществами. Поверхность бластодермы хорошо проницаема, по крайней мере, со стороны прилежащей к желтку. Все это облегчает адсорбцию добавляемых веществ. Данная тест-система представляет интерес ввиду того, что резкое замедление скорости сердечных сокращений является одним из первых физиологических признаков начала глубокого гипобиоза у животных. Необходимо также отметить, что увеличивающийся интерес к использованию куриных эмбрионов в биологических и фармацевтических исследованиях обусловлен простотой эксперимента и низкой стоимостью по сравнению с

использованием млекопитающих животных в качестве модели для тестирования различных веществ.

В данной статье мы представляем данные по исследованию скорости сердечных сокращений 38-часовых куриных эмбрионов под влиянием гипометаболической-гипотермической фракции мозга (с молекулярной массой 1-10 кДа) МСС (1-10), выделенной из мозга сусликов, находившихся в состоянии гибернации. Также было исследовано влияние 5'-АМФ, обнаруженного и выделенного из данной фракции.

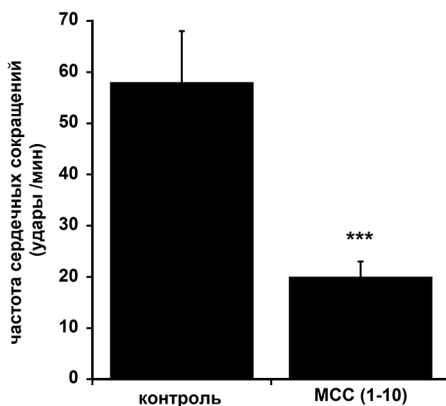
**Материалы и методы. Источник ткани и выделение гипометаболических факторов.** Длиннохвостые суслики (*Spermophilus undulatus*) были отловлены летом в Якутии. Летом и ранней осенью животных содержали в виварии при естественном световом дне и температуре +20-22°C в индивидуальных клетках. В ноябре месяце животные были перенесены в специально приспособленное темное помещение с температурой воздуха +4-6°C. Забор целого мозга проводили от активных животных в июне и июле месяце и от спящих – в январе и феврале на 5-7-ой день баута спячки. Для выделения фракций и их дальнейшей очистки использовался мозг активных и спящих сусликов [1]. Вкратце, мозг гомогенизировали в 1 М уксусной кислоте (1 гр. ткани/10 мл), нагревали на водяной бане в течение 30 мин, затем охлаждали и центрифугировали (40000 g, 45 мин). Супернатант использовался для последующей ультрафильтрации через мембраны Amicon PM-10 (отделяет фракцию >10 кДа) и UM-2 (отделяет фракцию <1 кДа). Дальнейшее выделение более узких биологически активных фракций и индивидуальных соединений проводили путем последовательного разделения фракции, содержащей вещества в диапазоне молекулярных масс 1-10 кДа, методом гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-25 super fine и высокоэффективной обращенно-фазной хроматографией на колонке Nucleosil 100-5 C18.

**Тестирование различных веществ на изолированных куриных эмбрионах.** Для данных экспериментов были использованы яйца (не более 3-х дней после кладки) от кур породы «кросс белый Леггорн» и «Домашней»; производство Заокской птицефабрики. Яйца помещали в инкубатор на 38 часов при температуре  $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . После этого бластодерма вместе с эмбрионом на стадии 10-11 пар сомитов были изолированы и помещались в стеклянную камеру. Камера, тщательно закрытая покровным стеклом для того, чтобы избежать высушивания эмбриона, помещалась в термостат, и наблюдение велось под микроскопом при постоянной температуре  $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . После 15 минут преинкубации, скорость сердечных сокращений была стабильна, по крайней мере, в течение 1-го часа. Через 15-20 минут к эмбриону добавляли либо 0.9% NaCl, либо исследуемые вещества. Камеры снова

помещали в термостат на 15-20 минут, после чего начинался основной подсчет скорости сердечных сокращений. Необходимо отметить, что на этой стадии развития (10-11 пар сомитов) эмбрион хорошо виден, и можно ясно отличить спинной мозг, сомиты, сердце, (с частотой сокращения 40-70 ударов в минуту), кровяные островки или сосудистую систему с циркулирующей кровью на более поздних стадиях развития. Наблюдения и подсчет скорости сердечных сокращений проводились под микроскопом с увеличением в 20-40 раз. Статистическую значимость различий определяли с использованием непарного  $t$  – критерия Стьюдента

**Результаты и дискуссия.** Мы исследовали изменение скорости сердечных сокращений 38-часовых куриных эмбрионов под влиянием фракции МСС (1-10), полученной из мозга сусликов, находившихся в состоянии зимней спячки.

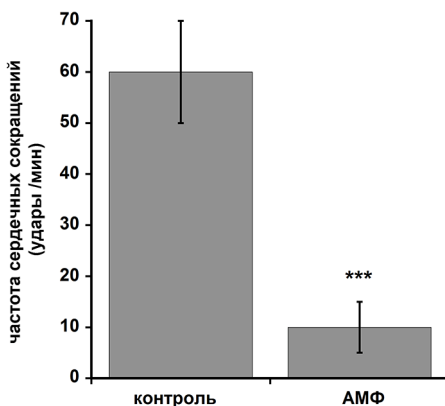
Как видно из рис. 1, 0.9% NaCl (100 мкл\эмбрион) не оказывал влияния на скорость сердечных сокращений через 30 минут после добавления. Фракция МСС (1-10) оказывала значительный ингибиторный эффект на скорость сердечных сокращений; через 30 минут после добавления скорость сердечных сокращения значительно уменьшалась с 60 ударов в минуту до 20 ударов в минуту. Наблюдения проводились в течение одного часа, к концу которого показатели достоверно не изменились.



**Рис. 1.** Эффект 0.9% NaCl (100 мкл\эмбрион) или фракции (1-10 kDa, 20 мкг\эмбрион), выделенной из мозга зимоспящих сусликов, на скорость сердечных сокращений 38-часовых куриных эмбрионов. Данные представлены как среднее  $\pm$  SE (7 экспериментов). \* –  $p < 0.0001$ , относительно контроля (непарный тест Стьюдента).

Необходимо отметить, что добавление фракции с молекулярной массой 1-10 kDa, выделенной из мозга активных сусликов, не вызывало изменения скорости сердечных сокращений. По-видимому, только в клетках мозга сусликов, находящихся в спячке, синтезируются гипометаболические вещества, способные замедлять скорость сердечных сокращений куриных эмбрионов.

Как было показано нами ранее, в активной фракции мозга и бурой жировой ткани содержится 5'-АМФ, функции и значимость которого в индукции и поддержании гипобиоза обсуждаются в настоящее время в литературе. [8,9].



**Рис. 2.** Изменение скорости сердечных сокращений 38-часовых куриных эмбрионов через 30 минут после добавления 5'-АМФ ( $10^{-7}$  М) или 0.9% NaCl (контроль). Данные представлены как среднее  $\pm$  SE (7 экспериментов). \* –  $p < 0.0001$ , относительно контроля (непарный тест Стьюдента).

В данной работе мы показали что 5'-АМФ в дозе  $10^{-7}$  М вызывал глубокое угнетение функции сердца, резко снижая частоту сердечных сокращений 38-часового куриного эмбриона через несколько минут после добавления вещества (рис. 2); в некоторых экспериментах происходила полная остановка сердца. Однако, действие 5'-АМФ было обратимо: после двукратной смены инкубационной среды, скорость сердечных сокращений восстанавливалась.

Наши данные находятся в согласии с результатами, ранее полученными на изолированных сердцах лягушки (*Rana temporaria*), которые показали, что АМФ уменьшает скорость и силу сердечных сокращений [9]. Было обнаружено увеличение концентрации исследованных нуклеотидов в мозгу зимоспящих сусликов в состоянии спячки. Показано, что АМФ, АДФ и аденозин резко снижали скорость сердечных сокращений у мышей [11]. Авторы постулировали, что АМФ

дефосфорилируется до аденозина, который снижает скорость сердечных сокращений, и снижает метаболизм и температуру тела животного. Эндогенный аденозин является важнейшим регулятором метаболизма в разных тканях. У большинства видов незимоспящих животных он снижает автономные функции. К примеру, внутрижелудочковое введение мышам аналогов аденозина вызывало дозо-зависимое падение температуры тела, а после микроинъекций в ствол мозга наблюдалась глубокое угнетение скорости сердечных сокращений и снижение кровяного давления у крыс [12]. Обнаружено, что аденозин осуществляет регуляцию сна, вызывая глубокий гипногенный эффект при центральном и периферическом введении [13]. Вопреки ожиданиям, измерение и сравнение концентрации аденозина в ряде отделов мозга, включая септум, гиппокамп и гипоталамус спящих и активных колумбийских сусликов (*Spermophilus columbianus*) показало уменьшение этого вещества в состоянии спячки [14].

Данные, полученные при исследовании скорости сердечных сокращений куриных эмбрионов при действии гипометаболической фракции 1-10 kDa и нуклеотида 5'-АМФ подтверждают значимость этих веществ для регуляции сердечных ритмов теплокровных (крыс, мышей и куриных эмбрионов) и хладнокровных (лягушек) животных и предполагают участие этих веществ в ингибировании общего метаболизма животных. Знание механизмов, ведущих к уникальной способности теплокровных гомойотермных и гетеротермных животных предчувствовать холод, адаптироваться к нему и противостоять холодному стрессу, необходимы для развития способности животных (в том числе и человека) к поддержанию регулируемых функций при потенциально летальных температурах, а также индукции перестройки работы клеток, органов и организмов в холоде, в состоянии гипоксии, перед криосохранением и трансплантацией органов и тканей.

Работа выполнена в рамках государственных заданий 075-01025-23-00 и 075-00957-23-01.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зиганшин П.Х., Свиряев В.И., Васьковский Б.В. и др. // Биоорган. Химия. 1994. 20: 899-918.
2. Kramarova L., Ziganshin R., Kokoz J., Bronnikov G. // Recent Research Developments in Endocrinology. Pandalai S.G. (ed). Research Signpost, Kerala. 2004. 5: 207-38.
3. Крамарова Л.И., Зиганшин П.Х., Гахова Э.Н. // Биоорган. Химия. 2009. 35: 597-609.
4. Ross A.P., Drew K.L. // Mini Rev. Med. Chem. 2006 6: 875-84.
5. Rouke B.C. // Hypometabolism in Animals. Hibernation, Torpor and Cryobiology. Lovergrove B.G., McKechnie A.E. (eds.). Pietermaritzburg: Interpack Books, 2008. 57-65.

6. Harlow H.J., Lohuis T., Beck T.D., Iaizzo P.A. // Nature. 2001. 409: 997.
7. Kondo N., Kondo J. // J. Biol. Chem. 1992. 267: 473-78.
8. Atanassov C.L., Naegelit H.U., Zenket G. et al. // Comp. Biochem. Physiol. 1995. 112: 93-100.
9. Ляшков А.Е., Негуляев О.В., Сосулина Л.Ю. и др. // Ж. Эвол. Биохим. Физиол. 1999. 35: 127-30.
10. Dawe A.R., Morrison P.R. // Am. Heart J. 1955. 49(3): 367-84.
11. Steven S., Swoap J., Iliff B., Le S. // Living in a Seasonal World Adaptations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. 30: 337-49.
12. Barraco R.A., Phillis J.W., Campbell W.R. et al. // Neuropharmacology. 1986. 25: 675-80.
13. Radulovacki M., Porter N.M., Green R.D. // Slow Wave Sleep: Physiological, Pathophysiological and Functional Aspects. New York. Raver Press. 1989. 243-56.
14. Lee T.F., Nurnberger F., Wang L.C.H. // Life in the Cold: Ecological, Physiological and Molecular Mechanisms. Westview Press. 1993. 317-22.

## НЕСТЕРОИДНЫЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ АГЕНТ ИНДОМЕТАЦИН МОДУЛИРУЕТ ТРАНСПОРТ Na<sup>+</sup> В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

*Мельницкая А.В.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Бадюлина В.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский  
университет, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Кожа амфибий – классический модельный объект для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт Na<sup>+</sup> в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. В работе этой системы принимают участие многочисленные Na<sup>+</sup>-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее производные являются важными сигнальными молекулами, выступающими в качестве местных гормонов и медиаторов, играющих важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессов [1]. Выделяют три основных пути метаболизма АК: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый) [1].

В почках и других реабсорбирующих эпителиях АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [2-5, 8-9]. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов [3-5]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

В экспериментах использовали ингибитор циклооксигеназ индометацин (1-(*p*-хлорбензоил)-5-метокси-2-метилиндол-3-уксусная кислота), широко применяющийся в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства (НПВС). НПВС оказывают противовоспалительное, обезболивающее и жаропонижающее действие за счет подавления синтеза простагландинов, ингибируя активность циклооксигеназ. Известно, что индометацин подавляет активность обеих форм циклооксигеназ – циклооксигеназы 1 и циклооксигеназы 2 [6] и является одним из наиболее широко используемых противовоспалительных препаратов с наивысшей эффективностью в моделях *in vitro* и *in vivo* [6,7].

**Методика.** Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (“World Precision Instruments, Inc.”, Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl<sub>2</sub>, 5 Tris HCl, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22-23°C).

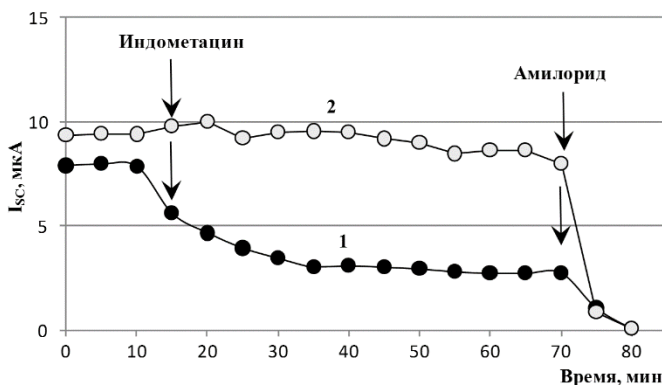
Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). Для измерения ВАХ на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал ( $V_T$ ) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при трансэпителиальном токе  $I_T = 0$ ). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{sc}$  ( $I_{sc} = I_T$  при  $V_T = 0$ ),  $V_{OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ .

Транспорт  $\text{Na}^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{sc}$ . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной



поверхности кожи. Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . На рис. 1 приведены результаты типичных экспериментов. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют:  $I_{SC} = 9.71 \pm 2.13$  мкА;  $V_{OC} = -12.85 \pm 3.46$  мВ;  $g_T = 0.6 \pm 0.08$  мСм.



**Рис. 1.** Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на приложение индометацина (40 мкМ) и амилорида (20 мкМ) (1) –  $I_{SC}$  после добавления индометацина со стороны апикальной поверхности кожи; (2) –  $I_{SC}$  после добавления индометацина со стороны базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Впервые показано, что индометацин подавляет транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. Обнаружено также, что степень и кинетика ингибирующего действия индометацина на транспорт  $Na^+$  различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления индометацина в концентрации 40 мкМ было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $49.95 \pm 11.09$  или  $9.04 \pm 2.35\%$ ,  $V_{OC}$  уменьшился на  $50.41 \pm 13.23$  или  $11.12 \pm 2.35\%$ , а  $g_T$  уменьшилась на  $8.81 \pm 0.92$  или  $5.05 \pm 0.09\%$ , при приложении индометацина со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что приложение индометацина со стороны базолатеральной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение  $I_{SC}$ : незначительное увеличение  $I_{SC}$ , наблюдаемое в течение 10-20 мин после приложения агента, сменяющееся подавлением  $I_{SC}$ , наблюдаемым в

течение всего последующего эксперимента. В случае добавления индометацина к апикальной поверхности кожи лягушки наблюдается резкое и значительное снижение  $I_{SC}$ , развивающееся непосредственно после приложения агента. Фаза увеличения  $I_{SC}$  в этом случае не наблюдалась. Сходные изменения были получены для величины  $V_{OC}$ .

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в коже лягушки простагландины стимулируют трансэпителиальный транспорт  $Na^+$ , усиливают секрецию ионов  $K^+$  и увеличивают проницаемость апикальной мембраны для воды [2]. В культуре клеток кортикальных собирательных трубочек почки мыши [5] и мочевом пузыре лягушки [8] ингибиторы циклооксигеназ диклофенак и ибупрофен подавляют  $I_{SC}$  и модулируют активность ENaC.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что степень ингибирующего действия индометацина на транспорт  $Na^+$  различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). Сходные результаты были получены при исследовании влияния аспирино-подобных НПВС на транспорт  $Na^+$  в коже лягушки *Rana temporaria* [9]. Сообщается, что добавление индометацина в концентрации 6 мкМ со стороны базолатеральной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение  $I_{SC}$ : наблюдается небольшое кратковременное (в течение 10 мин) увеличение  $I_{SC}$ , за которым следует устойчивое снижение величины  $I_{SC}$ . Подобный эффект являлся уникальной особенностью индометацина, и не наблюдался при действии других исследованных НПВС (аспирина, парацетамола, мефенамовой кислоты и фенилбутазона), приложении которых вызывало устойчивое снижение  $I_{SC}$ . Индометацин также был единственным ингибитором циклооксигеназ, который вызывал усиление влияния экзогенного простагландина E1 и вазопрессина на  $I_{SC}$  в коже лягушки [9]. Предполагают, что снижение  $I_{SC}$  может быть связано с ингибированием индометацином активности циклооксигеназ и подавлением синтеза простагландинов, тогда как начальное непродолжительное увеличение  $I_{SC}$  можно объяснить ингибирующим действием индометацина на активность фосфодиэстеразы, способствующим накоплению цАМФ в начальный период, предшествующий снижению уровня синтеза эндогенных простагландинов [9].

Известно, что транспорт  $Na^+$  в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные  $Na^+$ -транспортирующие белки (ENaC,  $Na^+$ - $K^+$  – АТФазы и  $Na^+$ / $H^+$ -обменники), локализованные в различных мембранах клетки. Добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта  $Na^+$ , что указывает на то, что влияние индометацина на транспорт  $Na^+$  связано, в основном, с модуляцией активности ENaC. Можно предположить, что влияние ингибитора

циклооксигеназ индометацина на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Полученные нами результаты о модулирующем влиянии индометацина на  $\text{ENaC}$  могут также представлять интерес в связи с данными литературы о способности ингибиторов циклооксигеназ изменять активность протонактивируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ $\text{ENaC}$ , к которому принадлежат и  $\text{ENaC}$ . Недавно было обнаружено, что НПВС снижают экспрессию ASIC и подавляют их активность [10-12]. В экспериментах на изолированных интернейронах гиппокампа и на рекомбинантных ASIC, экспрессируемых в клетках яичника китайского хомячка (CHO), было показано, что диклофенак и ибупрофен аллостерически подавляют ASIC-каналы, уменьшая максимальный индуцированный протонами ток и замедляя десенсibilизацию [11]. Действие НПВС зависит также от изоформы каналов: так, на ASIC1b и ASIC2a не влияет большинство НПВС, тогда как ASIC3 ингибируется салициловой кислотой и диклофенаком, а ASIC1a ингибируется флурбипрофеном и ибупрофеном [12]. Известно, что индометацин – один из наиболее эффективных препаратов для лечения первичных головных болей, таких как пароксизмальная гемикрания и континуальная гемикрания. Этот препарат используется также для купирования головных болей при болезни Альцгеймера и некоторых формах рака [7]. Однако до настоящего времени неизвестно, каковы механизмы такой высокой фармакологической эффективности индометацина при лечении головной боли. В связи с этим, полученные нами данные о модулирующем влиянии индометацина на активность каналов суперсемейства Deg/ $\text{ENaC}$  может способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов действия этого НПВС.

Таким образом, нами впервые показано модулирующее влияние индометацина на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки, что свидетельствует об участии циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки.

Результаты настоящего исследования имеют также практическую значимость. Известно, что несмотря на высокую терапевтическую эффективность в облегчении симптомов некоторых артритов и лечении подагры или коллагенозов, введение индометацина вызывает ряд побочных эффектов, таких как язвы желудочно-кишечного тракта, частые расстройства центральной нервной системы и нефротоксичность [6,7]. Данные о влиянии индометацина на трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  указывают на нежелательность совместного применения в клинической практике индометацина и диуретиков, ввиду возможного снижения натрийуретического эффекта последних. Полученные результаты

способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных индолуксусной кислоты, и могут быть полезны для применения индометацина в клинической практике, где данный препарат широко используется в качестве противовоспалительного, анальгезирующего и жаропонижающего средства.

Работа выполнена в рамках Договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03 от 12.03.2020.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wang B., Wu L., Chen J. et al. // Signal Transduct. Target Ther. 2021. 26: 6(1): 94.
2. Els W.J., Helman S.H. // J. Membr. Biol. 1997. 155: 75-87.
3. Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V., Jr. // Trends Neurosci. 1991. 14: 96-100.
4. Meves H. // Br. J. Pharmacol. 2008. 155: 4-16.
5. Pavlov T.S., Ilatovskaya D., Levchenko V. et al. // Am. J. Physiol. 2011. 301: F672-81.
6. Lucas S. // J. Head Face Pain. 2016. 56: 436-46.
7. Summ O., Evers S. // Current Pain and Headache Reports. 2013. 17(4): 327.
8. Shakhmatova E.L., Kuznetsova A.A., Prutskova N.P. et al. // Ross. Fiziol. Zh. Im I.M. Sechenova. 1997. 83(10): 68-75.
9. Hall W.J., O'Donoghue J.P., O'Regan M.G., Penny W.J. // J. Physiol. 1976. 258(3): 731-53.
10. Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. // J. Neurosci. 2001. 21: 8026-33.
11. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A. // J. Neurochem. 2008. 106: 429-41.
12. Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. // J. Neurosci. 2001. 21(20): 8026-33.

## АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА РАЗНЫХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ СТРЕТОЗОТАЦИНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА В КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ

*Новикова Е.В., Филиппов Ю.А., Степанов А.В., Кубасов И.В., Сухов И.Б., Чистякова О.В., Добрецов М.Г.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Сахарный диабет (СД) является самым распространенным эндокринологическим заболеванием в мире. Заболевание характеризуется хроническим гипергликемическим состоянием, развивающимся в результате недостаточности в секреции инсулина (СД 1 типа, СД1) или в результате потери тканевой чувствительности к инсулину (СД 2 типа, СД2). Согласно последним статистическим данным Международной диабетической федерации, в

2021 г. во всем мире насчитывалось около 536.6 млн человек (в возрасте 20-79 лет) с диабетом, а к 2045 г. это число вырастет до 783.2 млн [1]. В РФ по данным на 01.01.2021 общая численность пациентов с СД составляет 3% населения РФ, среди которых число случаев СД1 составляет всего около 5.5% [2]. Однако, заболеваемость СД1 продолжает расти во всем мире и, по сравнению с СД2, СД1 имеет тенденцию к гораздо более скорому развитию осложнений СД, включая развитие сердечной недостаточности – основной причиной высокой смертности среди СД пациентов [3,4]. При оценке состояния сердца и сердечно-сосудистой системы одной из ключевых ролей играет анализ электрокардиограммы (ЭКГ). По имеющимся литературным данным, основными изменениями в параметрах ЭКГ у человека и в животных моделях СД были: удлинение интервал QT, снижение ЧСС, а также изменение формы зубца Т и показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР) [5,6]. Однако, временная динамика этих и других изменений ЭКГ показателей СД остается плохо изученной. Таким образом, цель данной работы заключалась в исследовании и сравнении амплитудно-временных параметров ЭКГ в крысиной модели стрептозотоцинового (СТЗ) диабета (СД1) на разных сроках заболевания: 2, 4 и 8 недель.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на взрослых крысах-самцах Wistar. Диабет первого типа индуцировался введением СТЗ (35 мг/кг веса животного) внутривентрикулярно. Развитие и тяжесть СД1 подтверждались измерением случайной глюкозы в пробах капиллярной крови животных на 3-й, 14-й, 28-й и 56-й день после инъекции СТЗ. Стадию установившегося СД1 определяли как состояние, при котором глюкоза в крови превышала 11 мМ. Всего было исследовано 20 контрольных (К) и 25 диабетических (СД1). Регистрация ЭКГ производилась до введения СТЗ, а также на 14-й, 28-й и 56-й день эксперимента. В ходе опыта у крыс, наркотизированных изофлураном, регистрировали ЭКГ в трёх стандартных отведениях с помощью игольчатых электродов в течение 5 минут, используя электрокардиограф «Поли-Спектр-8/В» (Нейрософт, Россия). Полученные записи обрабатывались с помощью разработанной нами программе в среде MatLab («Matrix Laboratory»). Анализировалось только второе стандартное отведение, поскольку по направлению оно почти совпадает с анатомической осью сердца и максимальным суммарным вектором ЭДС.

Параметрами ЭКГ, которые были проанализированы и сравнены между разными группами животных и на разные дни исследования были величины основных зубцов кардиограммы: P, Q, R, S и T, длительность PQ, RR, QT и QTc (скорректированный в соответствии с ЧСС QT интервал по формуле Frideric – интервал QT, деленный на корень кубический RR-интервала) [7] интервалов, длительность QRS комплекса, частота сердечных сокращений (ЧСС), а также площадь под T-зубцом, как интегральный показатель процесса реполяризации миокарда. Также была

проведена оценка BCP. Рассчитывались: стандартное отклонение для RR-интервалов (SDRR, мс) от средней, которое является показателем общей BCP; процент RR-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущего более чем на 3 мс (pNN3); стандартные отклонения средних значений ЧСС и RR-интервалов, вычисленных по 1-минутным сегментам записи (SDAvgHR и SDAvgRR, соответственно), которые показывают медленные изменения ритма [8].

Статистическую обработку данных осуществляли стандартными методами в программе Origin 9.0 и GraphPad Prism 6. Все полученные экспериментальные данные проверяли на нормальность распределения (Шапиро-Вилк тест) и, в соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в контрольной и экспериментальных группах оценивали, как достоверные при  $p < 0.05$ , используя соответствующий непараметрический Kruskal-Wallis тест (с апостериорным тестом Dunn's Multiple Comparison) или параметрический тест ANOVA с апостериорным тестом Tukey's. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка.

**Табл. 1.** Параметры ЭКГ (среднее значение  $\pm$  ошибка) измеренной в экспериментальных группах животных по завершении 2-й, 4-ой и 8-ой недель эксперимента.

ЭКГ параметр	2-недели		4-недели		8 недель	
	К (n=20)	СД (n=25)	К (n=20)	СД (n=22)	К (n=19)	СД (n=22)
Зубец, амплитуда, мВ						
T	0.066 $\pm$ 0.004	0.070 $\pm$ 0.004	0.057 $\pm$ 0.005	<b>0.108 <math>\pm</math> 0.006*</b>	0.065 $\pm$ 0.007	<b>0.133 <math>\pm</math> 0.010*</b>
Интервал, длительность, мс						
QT	80 $\pm$ 2	84 $\pm$ 2	81 $\pm$ 2	90 $\pm$ 1	84 $\pm$ 1	<b>99 <math>\pm</math> 2*</b>
QTc	143 $\pm$ 3	147 $\pm$ 4	144 $\pm$ 3	155 $\pm$ 2	151 $\pm$ 3	<b>168 <math>\pm</math> 2*</b>
RR	176 $\pm$ 3	<b>189 <math>\pm</math> 2*</b>	176 $\pm$ 4	<b>193 <math>\pm</math> 3*</b>	178 $\pm$ 2	<b>203 <math>\pm</math> 5*</b>
Характеристики сердечного ритма и его регулярности						
ЧСС, сек <sup>-1</sup>	344 $\pm$ 6	<b>320 <math>\pm</math> 4*</b>	345 $\pm$ 6	<b>314 <math>\pm</math> 5*</b>	337 $\pm$ 5	<b>299 <math>\pm</math> 8*</b>
SDAvgHR, сек <sup>-1</sup>	5.9 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0.5	8.3 $\pm$ 1.1	<b>2.8 <math>\pm</math> 0.4*</b>
SDAvgRR, мс	3.0 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.6	<b>1.8 <math>\pm</math> 0.2*</b>

\* — значимо отличается от среднего в контроле ( $p < 0.05$ )

**Результаты.** По большинству из параметров (среди них: амплитуды зубцов P, Q, R, S; длительность интервалов PQ и QRS; показатели BCP SDRR и pNN3), которые были выбраны для исследования, результаты нашего анализа ЭКГ данных не обнаружили статистически достоверных различий между экспериментальными группами животных ни на одном из исследованных сроках эксперимента. (табл. 1) Однако наблюдалась тенденция к снижению амплитуды зубца T на 8-й недели эксперимента.

СД1 крысы, однако уже начиная со второй недели эксперимента, демонстрировали прогрессивную брадикардию и начиная с 4-ой недели эксперимента – статистически значимое увеличение T-зубца ЭКГ. При

этом, не было замечено никаких признаков аритмии, наоборот на восьмой неделе эксперимента стандартные отклонения средних значений ЧСС и RR-интервалов, вычисленных по 1-минутным сегментам записи (SDAvgHR и SDAvgRR, соответственно) были достоверно снижены по сравнению с таковыми в контрольных животных, предполагаая стабилизацию ритмичности сердечных сокращений СД1 крыс (табл. 1).

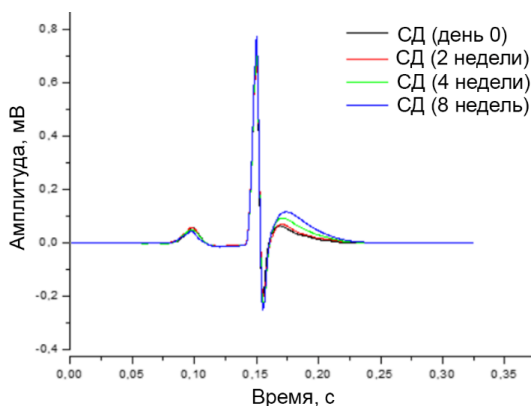
В 19 и 22 из всех изученных нами ЭКГ экспериментах контрольных и СД1 крысах, ЭКГ регистрации были проведены как до, так и на 2-й, 4-й и 8-й неделях эксперимента, позволяя, таким образом, сравнения в пределах каждого конкретного животного. В качестве дополнительных параметров в этих ЭКГ экспериментах были также измерены длина RT интервала, и ширина (длительность зубца, измеренная при 50% пиковой амплитуды) и площадь Т-зубца кардиограммы. Этот анализ подтвердил неизменность большинства из измененных характеристик ЭКГ 2-х, 4-х и 8-и недельных СД1 крыс и достоверное увеличение пика Т-зубца ЭКГ СД на 4-й и 8-й неделях эксперимента. Кроме того, на этом сроке было выявлено и достоверное увеличение как ширины, так и площади зубца Т СД1 крыс (табл. 2 и рис. 1).

**Табл. 2.** Параметры Т-зубца ЭКГ СД крыс (22 животных).

Параметр	Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	Неделя 8
Амплитуда, мВ	0.069 ± 0.006	0.074 ± 0.007	<b>0.103 ± 0.007*</b>	<b>0.133 ± 0.010*</b>
Ширина, мс	21 ± 1	21 ± 1	<b>25 ± 1*</b>	<b>28 ± 1*</b>
Площадь, мВ*мс	3.41 ± 0.33	3.98 ± 0.39	<b>5.85 ± 0.49*</b>	<b>8.37 ± 0.70*</b>
RT интервал, мс	18.3 ± 0.6	20.3 ± 0.5	<b>21.0 ± 0.7**</b>	<b>23.7 ± 0.9**</b>

\* – Значимо отличается от средних остальных групп.

\*\* – Значимо отличается от среднего в контроле (день 0).



**Рис. 1.** Наложение усредненных QRS комплексов СД1 крыс, характеризующих разные сроки эксперимента.

Полученные данные показывают, что даже в крысах с хронической гипергликемией развитие детектируемых изменений в параметрах Т-зубца ЭКГ требует времени (выявляется в крысах с 4-х, но не 2-х недельным СД).

Возникающие нарушения электрофизиологических свойств миокарда при СД затрагивают в большей степени процессы реполяризации миокарда желудочков [9], что и ведет к повышению риска развития жизнеугрожающих аритмий. Увеличение зубца Т является общим индикатором десинхронизации и замедления реполяризации желудочков сердца. Это можно объяснить тем, что при диабете, замедление реполяризации желудочков может быть вызвано гиперкалиемией, нарушением в активности и/или экспрессии  $K^+$  каналов и нарушениями в контроле внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [10].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sun H., Saeedi P., Karuranga S. et al. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2022. 183: 109119.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. и др. // *Сахарный диабет.* 2021. 24(3): 204-21.
3. Моргунова Т.Б., Глинкина И.В., Фадеев В.В. // *Медицинский совет.* 2021. 12: 220-7.
4. Retnakaran R., Zinman B. // *Lancet.* 2008. 371: 1790-9.
5. Veglio M., Borra M., Stevens L.K. et al. // *Diabetologia.* 1999. 42: 68-75.
6. Isaksen J.L., Graff C., Ellervik C. et al. // *J. Electrocardiol.* 2018. 51(6S): 72-7.
7. Konopelski P., Ufnal M. // *Physiol. Res.* 2016. 65: 717-25.
8. Морозова М.П., Гаврилова С.А., Иванов Е.В. и др. // *Сахарный диабет.* 2019. 22: 44-52.
9. Lengyel C., Virdg L., Vnru T. et al. // *Cardiovasc. Res.* 2007. 73: 512-20.
10. Hadova K., Kralova E., Doka G. et al. // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2021. 21: 118.

## ПРИНЦИПЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СЕТИ

*Ратушняк А.С., Хусаинов Р.Р., Проскура А.Л.*

ФИЦ Информационных и вычислительных технологий,  
Новосибирск, Россия

**Введение.** Моделирование внутриклеточных молекулярных сетей с целью выявления их функциональной роли сталкивается, как правило, с их неупрощаемой сложностью. Даже внутренняя молекулярная машина самых простейших одноклеточных организмов не может быть смоделирована без существенных упрощений. А такие упрощения ведут, как правило, к получению недостаточно функционально и прогностически валидных результатов. Проблемы связанные с анализом функции



биологических информационных молекулярных систем (БИМС) привели к попыткам создания их концептуальных, феноменологических и имитационных моделей [1-5 и др.]. Применяемые математические методы, как правило, не учитывают, что БИМС по сути являются цифровыми логическими устройствами. Молекулы, составляющие основу таких систем, могут находиться в ограниченном числе устойчивых состояний. Однако традиционные подходы к моделированию процессов в биосистемах, в большинстве случаев, базируются на математических методах, ориентированных на непрерывные процессы, сводящиеся к дифференциальным и интегральным уравнениям. Учитывая дискретность БИМС их моделирование, вероятно, наиболее продуктивно вести с использованием математического аппарата, применимого для дискретных моделей, таких как логические модели, вероятностные булевы сети, сети Петри, цепи Маркова, агентные модели и т.д. Создание алгоритмов работы БИМС имеет существенные количественные ограничения, обусловленные, кроме неупрощаемой сложности, их принципиальным параллелизмом. Все это не позволяет, практически, с использованием существующих технологий, достичь результата за астрономически обозримое время [например, 6-8]. В связи с этими проблемами возникает необходимость моделирования доступных по сложности БИМС и уже опираясь на такие модели и учитывая преобладание, эмерджентность организации биологических систем, попытаться наращивать сложность до пределов аппаратных ограничений. Представляется необходимым и возможным создание моделей предельно простых эволюционно первичных биоагентов, что позволяло бы предположить возможность формирования таких систем спонтанно.

Понятно, что возникновение и существование термодинамически открытых биосистем базируется на негэнтропийном принципе [9-11]. Для о реализации такого принципа система (супрамолекулярная конструкция, агент) должна обладать способностью к восприятию внешних сигналов их логической обработке, запоминанию, прогностике и реакции позволяющей реагировать на воздействия, стабилизируя или увеличивая суммарную негэнтропию. Т.е. такая система должна содержать: 1. набор рецепторов в соответствии с набором физических процессов в той пространственной (экологической) нише, в которой формируется агент; 2. набор эффекторов, позволяющих избежать энтропийных воздействий и/или приобретение информационных и энергетических ресурсов; 3. достаточно простую молекулярную конструкцию, выполняющую логические функции. Должно осуществляться выделение ассоциированных сигналов, запоминание ассоциации и опережающее включение соответствующих эффекторов.

В данной работе предпринята попытка поиска подхода к моделированию функций внутриклеточной информационной сети на базе работы простейшего негэнтропийного агента.

**Результаты. Принципы моделирования.** При моделировании негэнтропийных агентов, исходили из предположения, что БИМС по существу являются логическими устройствами, обладающими прогностической функцией, на базе информации, полученной при взаимодействии с окружающей средой. Предельно простые супрамолекулярные конструкции флукуационно формировались, вероятно, с некоторым «запасом», избытком упорядоченности – негэнтропии  $N$ . Взаимодействие с процессами, происходящими в окружающей энтропийной среде, приводило к уменьшению этой упорядоченности, суммарной негэнтропии в системе.

$$\Sigma N = N - \Delta N + I$$

Приобретенная при этом информация в дальнейшем «используется» молекулярной системой для прогнозирования подобных событий на время  $\Delta t$ . Благодаря этому, происходит уменьшение энтропии с некоторым «информационным коэффициентом»  $K_i$ , создавая дополнительный запас негэнтропии. Величина  $K_i$  зависит от объема полученной информации и, соответственно, от глубины возможного прогнозирования по времени.

$$N \cdot K_i = N_k$$

На основе таких физических представлений можно рассматривать парадигму работы живых систем. Условно, схему операций, выполняемых такой системой, можно представить следующим образом (рис. 1).



**Рис. 1.** P1 и P2 – рецепторы. Э – эффектор.

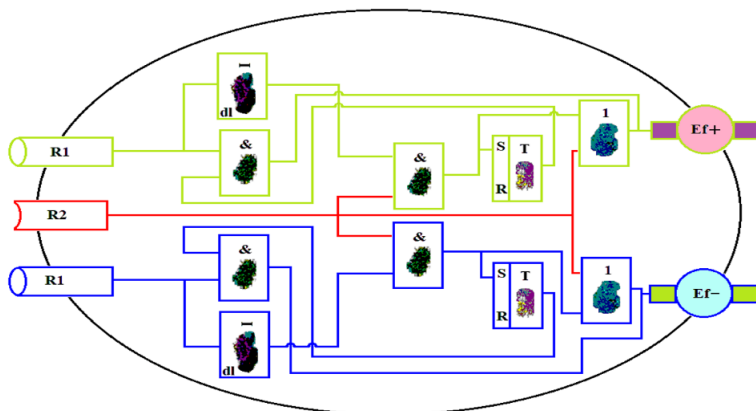
Молекулярные структуры, выполняющие роль рецепторов, преобразуют воздействия внешней среды в сигналы, передающиеся на молекулярные логические элементы, выполняющие определение связанности по времени внешних воздействий и реакцию на них включением эффектора [12]. Функции логической системы сводятся к оптимизации потерь/приобретений энергии и информации таким молекулярным устройством. При первичных ассоциированных сигналах эффектор включается только при действии фактора, существенно меняющего информационно-энергетическое состояние агента (активирующего P2). При этом предшествующий фактор (факторы) P1, запоминаются как

сигнальный. Связанность P1 и P2 сигналов запоминается. При возникновении в окружающей среде следующей пары взаимосвязанных сигналов, эффектор включается уже при действии первого фактора – сигнала P1, опережая, таким образом, действие второго фактора. Система при этом может избежать потерь или оптимизировать приобретение накапливая негэнтропию. На первом этапе не имеет принципиального значения основы взаимосвязи сигналов – ассоциация, корреляция или причинно-следственные отношения. Возможность отделения причинно-следственно и корреляционно связанных событий в дальнейшем может происходить на основе статистического анализа поступления связанных и не связанных сигналов.

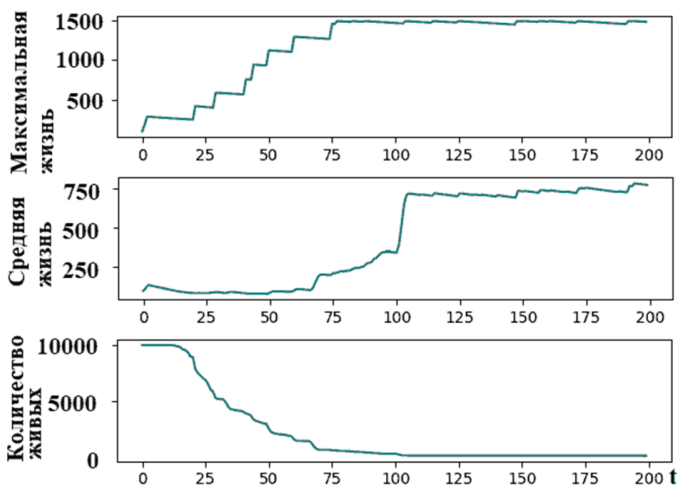
Достаточно простые молекулы на этапе возникновения негэнтропийных систем могли, вероятно, выполнять функции логических элементов. Наличие таких молекул в среде и простая логика системы позволяет предположить вероятность спонтанного возникновения подобных конструкций [13 и др.]. Расширение возможностей избегания повреждений и приобретения дополнительной информации и энергии, т.е. пространственной ниши, могло осуществляться при слиянии подобных комплексов, различающихся набором рецепторов и эффекторов. При этом, эволюция супрамолекулярных систем могла идти не на основе их размножения, а при слиянии и дроблении агентов с отбором устойчивых к факторам среды в определенной нише. Спонтанная фиксация в молекулярной системе ассоциативных пар могла опережать изменения в среде, что приводило к повышению устойчивости таких агентов и расширения ниши их распространения.

**Модель негэнтропийного агента.** Имитационная модель системы разработана на базе схемы логических операций представлена на рис 2.

На базе естественнонаучных представлений о биологических функциональных системах [14-17] и доархейных прототипах таких систем, сформирована модель и программное решение для негэнтропийного логического агента и его взаимодействия со средой. В параметрах среды заложено наличие молекулярных элементов, из которых, с задаваемой вероятностью, могут спонтанно формироваться агенты. Подобрано сигнальное наполнение различной модальности, оптимизировано количество элементов (обладающих логическими функциями) и определяющими вероятность возникновения и сохранения агента. Определен набор условий, коэффициентов, их значений и правил для агента и его взаимодействия со средой. Пример динамики «эволюции» при одном из вариантов задаваемых параметрах среды и агента представлен на рис. 3. Количество агентов при взаимодействии со средой постепенно сокращается и затем стабилизируется на определенном уровне. Т.е. из множества спонтанно возникающих, отбираются агенты с параметрами, соответствующими возможности их непрерывного существования в среде с заданными и, в конкретной реализации, неизменными характеристиками.



**Рис. 2.** Схема логических операций, выполняемых элементарной молекулярной негэнтропийной прогностической информационной системой. R1 и R2 – рецепторы внешних сигналов. dl – элемент задержки сигнала. & – элемент, выполняющий логическую операцию «И». I – элемент, выполняющий логическую операцию «ИЛИ», T – элемент памяти (триггер). Ef+ и Ef- – эфффекторы.



**Рис. 3.** Пример динамики адаптации негэнтропийных агентов при заданных параметрах среды и агента.

**Закключение.** Можно предположить, что в составе

внутриклеточных сигнальных сетей, кроме известных, – рецепции, усиления сигналов и включения эффекторов, присутствуют еще и удачно сформированные в процессе длительной эволюции молекулярные системы выявления и запоминания ассоциативных воздействий, обеспечивающие опережающие реакции системы и стабилизирующие, таким образом, гомеостаз. Выявление и инструментальное моделирование таких многоуровневых негэнтропийных молекулярных конструкций является задачей дальнейшего детального анализа внутриклеточной молекулярной сети, на примере относительно простых сетей в синапсах [18 и др.].

Такой подход к моделированию функций внутриклеточной информационной сети на базе работы простейшего негэнтропийного агента представляется наиболее перспективным.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nakajima T. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2015. 119(3): 634-48.
2. Goranson T., Cardier B., Devlin K. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2015. 119(3): 420-36.
3. Liao J.C., Boscolo R., Yang Y.L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100(26): 15522-7.
4. Kraus M., Lais P., Wolf B. // Biosystems. 1992. 27(3): 145-69.
5. Marijuán P.C., Navarro J., del Moral R. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2015. 119(3): 469-80.
6. Guffanti A. // Genome Biol. 2002. 3: reports 4031.1
7. Kriete A., Eils R. Computational Systems Biology. Cambridge: Elsevier Academic Press. 2006.
8. Kitano H. // Science. 2002. 295(5560): 1662-4.
9. Schrödinger E. What is life? The physical aspect of the living cell. Cambridge: University Press. 1944. 214
10. Finkelstein A., Hetherington J., Li L. et al. // Computer. 2004. 37(5): 26-33.
11. Aristov V.V., Buchelnikov A.S., Nechipurenko Y.D. // Entropy (Basel). 2022. 24(2): 172.
12. Ratushnyak A.S., Zapara T.A., Proskura A.L. et al. // Studies in computational intelligence. 2022. 1064: 231-37.
13. Hirst A.R., Escuder B., Miravet J.F., Smith D.K. // Angew. Chem. Int. Ed. 2008. 47.
14. Krushinsky A. // Russian Journal of Cognitive Science. 2015. 2(1): 231-7.
15. Anokhin P.K. // Vopr. Philosophy. 1962. 6: 97-109.
16. Анохин П.К. Основные вопросы теории функциональных систем. Философские аспекты теории функциональных систем. М: Наука, 1978: 49-106.
17. Tsitlovsky L. // International Journal of General Systems. 2015. 44(6): 655-66.
18. Proskura A.L., Vechkapova S.O., Ratushnyak A.S. // Procedia Computer Science. 2020. 169: 668-72.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ АТР ВО ВКУСОВОЙ ПОЧКЕ

*Рогачевская О.А., Черкашин А.П., Хохлов А.А., Колесников С.С.*

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

**Введение.** В настоящее время считается, что АТР – основной нейромедиатор периферической вкусовой системы, обеспечивающий трансдукцию вкусовых стимулов всех модальностей. Эта точка зрения основана прежде всего на том, что генетически модифицированные животные, у которых инактивированы гены ионотропных P2X2 и P2X3 пуринорецепторов, функционирующих в форме P2X2/P2X3 олигомера на окончаниях вкусового нерва, тотально теряют чувствительность к вкусовым стимулам [1]. Вкусовые стимулы детектируются специализированными рецепторами, расположенными на апикальном участке вкусовых рецепторных клеток, которые гетерогенны и включают три типа (ВКТ I–III) [2]. ВКТ I выполняют преимущественно поддерживающую функцию, ВКТ II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов и стимулов категории умами, ВКТ III детектируют кислые и некоторые соленые стимулы. Последние – единственные из клеток вкусовой почки образуют классические химические синапсы с окончаниями афферентного вкусового нерва; в ВКТ II функционирует уникальный безвезикулярный химический синапс, образованный атипичной митохондрией, физически отделяющей небольшую часть цитоплазмы и участок мембраны с кластеризованными АТР-проницаемыми каналами CALHM1/3, локализованный в точках контакта с нервными окончаниями; в ВКТ I подобных структур не выявлено [2-4]. Таким образом, стимул-зависимый выброс афферентного нейротрансмиттера АТР могут осуществлять ВКТ II и ВКТ III. Для анализа секреции АТР одиночными клетками и тканями используется ряд методов, включая люциферин-люциферазный метод, метод клеток АТР-сенсоров, а также окрашивание АТР-содержащих везикул специфическими красителями [5], последние два использовались в представленной работе. Для регистрации выброса АТР в условиях физиологически адекватной стимуляции, когда стимулирующие вещества воздействуют только на апикальную часть клеточной мембраны, нами была разработана уникальная методика на основе модифицированной камеры Уссинга и люциферин-люциферазного метода [6]. Эта методика позволила осуществлять неоднократную вкусовую стимуляцию и визуализовать секрецию АТР on-line, что дополнило наши представления о работе периферического вкусового анализатора.

**Материалы и методы.** *Выделение вкусового эпителия* языка жиры, содержащего желобоватый вкусовой сосочек, проводилось по стандартной методике с использованием инъекции под эпителий изолированного языка смеси ферментов и инкубации в бескальциевом растворе [4,6-9].

*Эксперименты с клетками-сенсорами:* в качестве клеток-сенсоров АТР использовались клетки COS и CHO (P2X2/P2X3), культивируемые по стандартной методике, которые прокрашивались флуоресцентным зондом Fluo-8 и помещались в одну камеру со вкусовыми клеткам. Для получения одиночных клеток участок эпителия крепился к резиновой подложке изнанкой вверх и из него механически стеклянной пипеткой извлекались вкусовые клетки и почки и помещались в экспериментальную камеру [4,9]. Электрическую активность вкусовых клеток регистрировали методом patch-clamp в конфигурации perforated patch с использованием усилителя Axopatch 200 В, ЦАП-АЦП конвертера Digidata 1440А и программ pClamp10.3 (Axon Instruments, Сингапур), клетки-сенсоры визуализовали с использованием микроскопа Axioscop-2, объектива LD A-Plan 32× (Carl Zeiss, Германия), цифровой ECCD камеры LucaR (AndorTechnology, США), осветителя на сверхярких диодах собственной разработки, программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США) [4,8-9].

*Эксперименты с окрашиванием АТР-содержащих везикул* осуществлялись на одиночных клетках и клетках в составе почек на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5, объектив Plan Achromat HCX PL APO Lambda Blue 63× 1.4 Oil UV, программа LAS AF (Leica, Германия). Возбуждение осуществлялось лазером 488 нм, эмиссия регистрировалась от 505 до 555 нм [10].

*Регистрация выброса АТР вкусовым эпителием,* содержащим желобоватый сосочек, осуществлялась в модифицированной камере Уссинга, в верхней ячейке камеры производили подачу вкусовых веществ, нижнюю заполняли смесью 10 мМ калиевой соли люциферина и 0.1 мкг/л рекомбинантной люциферазы в физиологическом растворе [6-7]; для регистрации хемиллюминесценции использовали микрофотометр Model 814 (PTI, США), работающий в режиме счёта фотонов, модуль BrightBox (PTI, США), ПО Felix32 (PTI, США).

Базовый внеклеточный раствор содержал, мМ: 135 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-NaOH (NaOH), pH 7.4. Система перфузии [9] обеспечивала смену раствора в камере со скоростью 0.1-1 мл/с. Опыты проводили при комнатной температуре 22-24°C. Все эксперименты проводились при температуре 22-25°C, реактивы фирм Sigma-Aldrich, Worthington, Molecular Probes, Tocris (США) [6-10].

**Результаты и обсуждение.** В нашей лаборатории анализ секреции АТР из одиночных идентифицированных вкусовых клеток был осуществлен методом клеток-сенсоров, в качестве которых использовались клетки, экспрессирующие рецептор АТР и генерирующие клеточный ответ на появление нейромедиатора: 1) СНО, экспрессирующие рекомбинантный гетеродимерный ионный канал P2X2/P2X3; 2) клетки COS с эндогенными P2Y рецепторами. Располагаемые в непосредственной близости от вкусовых клеток, эти клетки-сенсоры позволяют детектировать наномолярные концентрации секретирующегося нейромедиатора в локальном объеме экспериментальной камеры [9]. Тип вкусовой клетки устанавливался электрофизиологически [8] или неинвазивно [10] (в этом случае вкусовые клетки так же прокрашивались флуоресцентным зондом Fluo-8), используя разработанные в нашей лаборатории критерии для идентификации типа клетки.

В прямых экспериментах было показано, что ВКТ II, специализирующиеся на детекции горьких и сладких стимулов и аминокислот, в ответ на вкусовые стимулы секретируют АТР в качестве афферентного нейротрансмиттера  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым образом через потенциал-зависимые ионные каналы [9], которые в дальнейших исследованиях наших коллег были идентифицированы как потенциал-зависимые ионные каналы CALHM1/3 [3]. Изменение потенциала на мембране ВКТ II возникает в процессе генерации потенциалов действия в ответ на вкусовую стимуляцию, и поскольку АТР-проницаемый канал сильно потенциал-зависим, это обеспечивает заметный выход АТР только при деполяризации выше  $-10$  мВ [11], что обуславливает надежность механизма секреции при вкусовых стимулах разной интенсивности. Кроме того, высвобождение АТР под действием ПД придает квантовый характер стимул-зависимой секреции афферентного нейротрансмиттера, как это имеет место в классических химических синапсах [4,11].

Вкусовая стимуляция ВКТ III не приводила к генерации ответов клетками-сенсорами АТР [9-11], поэтому мы осуществили серию экспериментов с использованием конфокальной микроскопии и флуоресцентного красителя куинакрина, который специфически окрашивает АТР-содержащие везикулы в цитоплазме клеток [5]. Мы предполагали наблюдать высвобождение красителя из везикул ВКТ III в ответ на стимуляцию раствором с высоким содержанием KCl, что должно было вызывать деполяризацию ВКТ III, поскольку ранее мы показали активацию ПЗ  $\text{Ca}^{2+}$  каналов и генерацию внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$  сигналов, вызванную аппликацией 70 мМ KCl [8-10]. После окрашивания куинакрином в клеточном препарате наблюдалось около 10-18% клеток (соответствует процентному содержанию ВКТ III во вкусовых почках), содержащих флуоресцирующие гранулы, которые полностью исчезали после стимуляции 70 мМ KCl, причем способность KCl уменьшать число



АТР-содержащих везикул зависела от активности ПЗ  $\text{Ca}^{2+}$  каналов [10]. Мы рассматриваем это явление как свидетельство того, что деполяризация клеток типа III инициирует экзоцитоз АТР, что подтверждает его роль как афферентного нейротрансмиттера в этих вкусовых клетках.

Используя оба вышеописанных подхода для исследования стимул-зависимой секреции нейромедиаторов, практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток, поэтому для on-line мониторинга секреции АТР в условиях физиологически адекватной стимуляции нами была разработана уникальная методика на основе подхода Уссинга и люциферин-люциферазного метода [6-7]. Для этого фрагмент языкового эпителия, содержащего желобоватый вкусовой сосочек, закреплялся в модифицированной камере Уссинга, которая за счёт физической изоляции апикальной и базолатеральной частей позволила стимулировать отдельно апикальную часть вкусовых клеток, экспонированную в верхнюю ячейку камеры, и детектировать АТР, секретирующийся из базальной части эпителия в нижнюю ячейку, заполненную смесью люциферин-люциферазы. Эта методика позволила визуализировать выброс АТР языковым эпителием *ex vivo* в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами при сохранении жизнеспособности вкусовой ткани и ее способности отвечать на горькие вещества в течение нескольких часов. Используя этот подход, мы впервые продемонстрировали зависимость трансдукции вкусового сигнала от содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в растворе со вкусовыми веществами, а также участие ПЗ  $\text{Na}^+$ -каналов в усилении TRPM5-опосредованной деполяризации, вызванной вкусовой стимуляцией [6-7].

Таким образом, применение описанных подходов, разработанных в нашей лаборатории, позволило получить новые результаты, которые помогли экспериментально подтвердить наши гипотезы и расширили представления о работе периферической вкусовой системы в части трансформации воспринятого вкусового сигнала в сигнал секреции нейромедиаторов для нервных окончаний, иннервирующих вкусовую ткань [4,6-11]. Разработанные методики так же могут использоваться при изучении секреции нейромедиаторов другими типами клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-14-00031.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Finger T.E., Danilova V., Barrows J. et al. // Science. 2005. 310(5753): 1495-9.
2. Yang R., Dzowo Y.K., Wilson C.E. et al. // J. Comp. Neurol. 2020. 528(5): 756-71.
3. Kashio M., Wei-Qi G., Ohsaki Y. et al. // Sci. Rep. 2019. 9(1): 2681.
4. Romanov R.A., Lasher R.S., High B. et al. // Sci. Signal. 2018. 11(529): 1-11.
5. Rajendran M., Dane E., Conley J., Tantama M. // Biol. Bull. 2016. 231(1): 73-84.
6. Рогачевская О.А., Хохлов А.А. Колесников С.С. // Приборы и техника эксперимента. 2023. 2: 155-8.
7. Хохлов А.А., Рогачевская О.А. // Биологические мембраны. 2021. 38(3): 1-5.

8. Romanov R.A., Kolesnikov S.S. // Neurosci. Lett. 2006. 395: 249-54.
9. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F. et al. // EMBO J. 2007. 26(3): 657-67.
10. Черкашин А.П., Рогачевская О.А. // Биологические мембраны. 2020. 37(4): 282-6.
11. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Kolesnikov S.S. // J. Gen. Physiol. 2008. 132(6): 731-44.

## ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШИ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ НЕ ВОСОСТАНАВЛИВАЕТСЯ ЗА НЕДЕЛЮ РЕАДАПТАЦИИ

*Россомахин Р.А., Дмитриева С.А., Нуруллин Л.Ф., Тяпкина О.В.*

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное  
подразделение ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

**Введение.** Планирование пилотируемых космических полетов человеком требует всестороннего изучения воздействия на организм сопровождающих их факторов, а также поиска методов профилактики негативного воздействия для сохранения здоровья и работоспособности космонавтов. При пребывании в условиях космического полета в организме у млекопитающих наблюдается изменение редокс-статуса, которое может вызывать как адаптивные, так и патологические реакции [1-4]. Одним из основных редокс-метаболитов является перекись водорода ( $H_2O_2$ ), регулирующая множество процессов. Считается, что малоновый диальдегид (МДА) также является интермедиатом перекисного окисления липидов (ПОЛ) активными формами кислорода в клетке, а повышенный уровень его продукции служит маркером оксидативного стресса.

Исследования на грызунах, находящихся в условиях реальной и моделируемой гипогравитации, продемонстрировали повышение уровня окислительного стресса, активирующее атрофию в скелетных мышцах. Увеличение уровня перекисного окисления липидов отмечено в клетках гипоталамуса, в стволе головного мозга, мозжечке, лобной коре, гиппокампе, стриатуме у мышей, в сонных артериях крыс, а также в эритроцитах. В печени мышей после космического полета выявлено снижение активности ферментов антиоксидантной защиты, ведущее к активации аутофагии [5]. Однако, как происходит реадaptация у животных и человека после возвращения на Земле к нормальным условиям гравитации остается малоизученным, в частности в печени.

Для моделирования эффектов космического полета на Земле широко применяется модель антиортостатического вывешивания (АОВ), воспроизводящая не только функциональную разгрузки мышц, но и

перераспределения крови, смещение внутренних органов у грызунов, аналогичные пребыванию в условиях невесомости и постельного режима человеком.

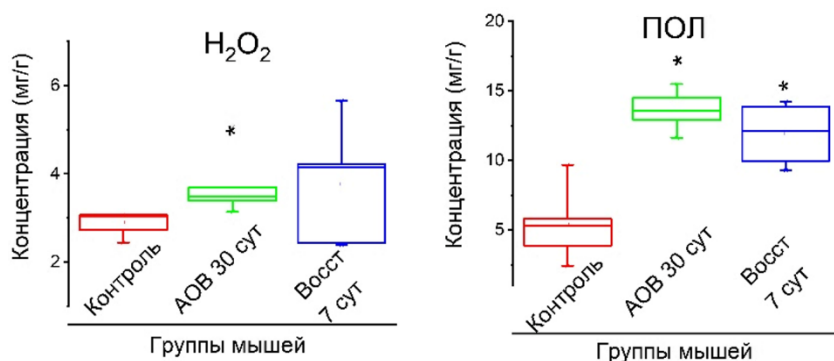
Таким образом, исследование уровня окислительного стресса в печени мышей после длительного 30 суточного антиортостатического вывешивания позволит сопоставить эти изменения и изменениями редокс-статуса в печени у мышей после реального космического полета, и также насколько модель антиортостатического вывешивания воспроизводит эффекты реального космического полета, а так же выяснить степень продукции  $H_2O_2$  и МДА после 7 суточного восстановительного периода после гравитационной разгрузки.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей линии c57bl/6, контрольная группа находилась в стандартных условиях вивария ( $n = 5$ ), подопытные мыши группы антиортостатического вывешивания 30 суток (АОВ 30 сут) находились в специальных клетках с пониженным головным концом и приподнятым задним, за счет подвешивания за хвост, ( $n = 5$ ) и группа мышей восстановления (Восст 7 сут), находящихся 7 суток в обычных условиях вивария после 30 суточного АОВ ( $n = 5$ ). Все процедуры с животными одобрены Комиссией по Биоэтике Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук (протокол № 12-3 от 28.02.2023 г.).

Концентрации  $H_2O_2$  измеряли путем окисления двухвалентного железа с помощью реагента FOX1, содержащего (в мМ): 0.5  $ZnSO_4$ , 0.5  $(NH_4)_2SO_4$ , 50  $H_2SO_4$ , 0.2 ксиленоловый оранжевый, 200 D-сорбитол (Sigma, США) с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Образцы печени фиксировали в жидком азоте, затем гомогенизировали в холодном буферном растворе (0.1 М 4-морфолинэтансульфоновой кислоты при pH 6.0, в соотношении 1:10) и центрифугировали в течение 10 минут при 10000 g. Супернатант смешивали с реагентом FOX1 в равных объемах. После 30 мин инкубации супернатант анализировали спектрофотометрически ( $\lambda = 560$  нм). Каждое измерение производилось не менее 3 раз, а затем усреднялось. Содержание пероксида в образцах определяли со ссылкой на калибровочную кривую, полученную с известными концентрациями  $H_2O_2$ . Уровень  $H_2O_2$  выражался в мкг/г тканей. Малоновый диальдегид, определяли спектрофотометрически по методу Ohkawa. При низком pH и повышенной температуре МДА легко участвует в реакции нуклеофильного присоединения с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТВА), образуя красный флуоресцентный аддукт 1:2 МДА. После гомогенизации гомогенат ткани смешивали в соотношении 1:1 с 0.3% Triton X-100, 0.1 М HCl, 0.03 М ТВА. Смесь нагревали в течение 45 минут при 95°C и центрифугировали в течение 10 минут при 10000 g. Поглощение супернатанта контролировали при 532 нм и 560 нм ( $\epsilon_{TBAMDA} = 1.55 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). Уровни МДА выражали

в мкг/г тканей. Статистическую обработку выполняли в программе Origin 2019b. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка. Достоверность различий между группами анализировали непараметрическим U-критерием Манна-Уитни (при  $p \leq 0.05$ ).

**Результаты.** В ходе экспериментов установлено, что в гомогенатах печени мышей контрольной группы средние значения концентрации  $H_2O_2$  составили  $2.8 \pm 0.1$  мкг/г, у мышей после 30 суток антиортостатического вывешивания –  $3.7 \pm 0.2$  мкг/г. В группе животных после 7-суточного периода восстановления концентрация  $H_2O_2$  составила  $3.7 \pm 0.6$  мкг/г. Исследование концентрации малонового диальдегида в печени у мышей контрольной группы показало, что средние значения составили  $5.4 \pm 1.2$  мкг/г, а после 30 суток – АОВ  $13.6 \pm 0.5$  мкг/г. У мышей после 7 суток восстановления после 30 суток АОВ концентрация МАД составила  $11.9 \pm 1.1$  мкг/г.



**Рис. 1.** Динамика изменения продукции перекиси ( $H_2O_2$ ) и малонового диальдегида (ПОЛ) в печени мышей после 30-суточного антиортостатического вывешивания (АОВ 30 сут) и 7-суточного восстановления после 30-суточного антиортостатического вывешивания относительно контрольных животных (\* – при  $p \leq 0.05$ ). Приведены абсолютные значения концентрации  $H_2O_2$  и ПОЛ в мкг/г.

Статистический анализ результатов выявил достоверное увеличение уровня перекиси водорода на 32% ( $p < 0.05$ ) и малонового диальдегида на 140% ( $p < 0.05$ ) в печени у мышей, находящихся в условиях моделирования эффектов космического полета. Повышенный уровень продукции  $H_2O_2$  и МАД выявленный у мышей после 30 суток АОВ регистрировался и у мышей после 7-суток восстановительного периода и составил повышение на 32% ( $p < 0.05$ ) и на 109% ( $p < 0.05$ ) соответственно.

Таким образом, длительное моделирование гипогравитационной разгрузки приводит к росту продукции  $H_2O_2$  и продукта перекисного

окисления липидов – малонового диальдегида, а 7-суточный период восстановления не позволяет возвратиться к исходным значениям.

**Обсуждение.** Печень отвечает за различные физиологические функции в организме, является основным метаболическим органом, обеспечивающим синтез белков плазмы, секреции желчи, протекание метаболических процессов и иммунную защиту. Накапливается всё больше данных, демонстрирующих что гипогравитация приводит к развитию дисфункции печени. У космонавтов после полета регистрируется диабетогенный фенотип: в крови повышенная концентрация глюкозы и уровень общего холестерина и липопротеинов низкой плотности на фоне снижения уровня липопротеинов высокой плотности. В печени мышей показано усиление глюконеогенеза, проявления которого коррелируют с продолжительностью полета, а также накопление липидных капель и стеатоз, напоминая ранние стадии развития неалкогольной жировой болезни печени, приводящий к её воспалению и фиброзу с необратимым повреждением тканей печени [4]. Эти изменения сопровождаются значительными изменениями в генах, кодирующих белки антиоксидантной защиты в печени мышей после космического полета [5]. Вышеописанная дисфункция печени увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2 типа и является фактором риска развития гепатоцеллюлярной карциномы [4].

Проведение экспериментов в реальном космическом полете затруднено из-за дороговизны, сложного оборудования и длительного подготовительного периода. В качестве альтернативы было разработано несколько наземных моделей для исследования эффектов воздействия невесомости на функции организма и, в частности, печени. Антиортостатическое вывешивание за хвост – модель, которая широко используется для изучения механизмов развития нарушений в различных органах и системах, таких как сердечно-сосудистая, нервная системы, поперечно-полосатая мускулатура, кости.

В настоящем исследовании в печени у мышей после длительного 30 суточного АОВ установлено повышение концентрации  $H_2O_2$  и МАД, повышенным уровень продукции ПОЛ остается в течение недели после АОВ. Этот результат согласуется с данными о изменении редокс-статуса, в организме млекопитающих в ответ на пребывание в условиях гипогравитации [1-4]. Данные о восстановлении состоянии печени после практически отсутствуют и требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, можно заключить, что реакция печени мышей на АОВ аналогична реакции на космический полет, что соответствует данным о росте окислительного стресса в ответ на гипогравитацию. Недельного периода реадaptации после АОВ недостаточно для возвращения уровня продукции  $H_2O_2$  и МДА к контрольным значениям.

Исследование проведено в рамках Госзадания с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Takahashi K., Okumura H., Guo R., Naruse K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(7): E1426.
2. *Pecaut M., Mao X., Bellinger D. et al.* // *PLoS One.* 2017. 12(5): E0174174.
3. *Tahimic C.G.T., Globus R.K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(10): E2153.
4. *Jonscher K., Alfonso-Garcia A., Suhaim J. et al.* // *PLoS One.* 2016. 11(4): E0152877.
5. *Blaber E., Pecaut M., Jonscher K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(10): E2062.

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭНДОЦИТОЗА НА РАЗВИТИЕ РЕПЕРFUЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

*Степанов А.В., Филиппов Ю.А., Новикова Е.В.,  
Добрецов М.Г., Кубасов И.В.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из главных причин смертности в развитых странах, причем на острый инфаркт миокарда приходится до 50% всех смертей. Основной причиной инфаркта является ишемическое поражение сердечной мышцы, обусловленное нарушением кровоснабжения при атеросклерозе, тромбозе или спазме коронарной артерии. Именно поэтому основные терапевтические подходы при острой ишемии направлены на восстановление кровотока в повреждённом сосуде (реперфузия). Как ни странно, реперфузия влечёт за собой увеличение зоны ишемического поражения (феномен ишемии-реперфузии (ИР)). Показано, что до 50% от общего размера инфарктной зоны при острой ишемии может быть обусловлено именно реперфузионным повреждением [1]. Накопившийся во время ишемии сукцинат быстро окисляется с началом реперфузии, что, в конечном итоге, инициирует продукцию активных форм кислорода, которые, распространяясь с кровотоком в незатронутые ишемией ткани, могут индуцировать повреждение кардиомиоцитов [2]. Помимо этого, смерть кардиомиоцитов в зоне ишемии, сопровождающаяся повреждением их клеточной мембраны, приводит к высвобождению широкого спектра биологически активных соединений [3-6]. Некоторые из них высвобождаются в достаточном количестве, чтобы при реперфузии активировать апоптоз в кардиомиоцитах, не входящих непосредственно в зону ишемии. Таким образом, восстановление кровотока хоть и снижает клеточную гибель в зоне первичного поражения миокарда, но одновременно способствует экспорту факторов повреждения в удаленные районы миокарда, способствуя расширению зоны вторичного повреждения.

Большинство растворимых факторов, высвобождающихся в некротических тканях, захватываются близлежащими кардиомиоцитами в процессе эндоцитоза, поскольку именно эндоцитоз лежит в основе большинства форм физического обмена между клетками и межклеточным пространством. Данный факт послужил основой для предположения о том, что частичное ингибирование эндоцитоза может предотвращать последствия экспорта сигналов повреждения из некротического участка миокарда в здоровую ткань, что отчасти и было подтверждено *in vitro* в экспериментах на кардиомиоцитах [7]. Помимо этого, было показано, что частичное подавление эндоцитоза оказывает, нейропротекторное действие при повреждении спинного мозга [8] и защищает митохондрии от повреждения в модели ИР на изолированном сердце крысы [9].

Тем не менее, несмотря на эти результаты, эффективность данного подхода (кратковременное подавление эндоцитоза для ограничения вторичного повреждения кардиомиоцитов при ИР) пока еще не была исследована на животных моделях.

Таким образом, цель данного исследования заключалась в проверке гипотезы, что ингибирование эндоцитоза является эффективным способом ограничения прогрессивного реперфузионного повреждения миокарда.

**Материалы и методы.** Исследования выполнялись на сердцах крыс-самцов линии Wistar (возраст и вес на начало эксперимента 2-4 месяца и 250-300 г). Операция по коронароокклюзии с последующей реперфузией через 45 минут (ИР-крысы) выполнялась на животных, наркотизированных зоветилом (40 мг/кг) и ксилазином (10 мг/кг). У ложнопериорированных животных (ЛО-крысы) производилась торакотомия без коронароокклюзии. Части животных производили внутрибрюшинное введения блокатора эндоцитоза хлорпромазина (0.5 мг/кг) за 15-20 минут до операции по коронароокклюзии (ИР/ХП-крысы).

Для оценки размера зоны некроза использовались поперечные срезы сердца ЛО-, ИР- и ИР/ХП-крыс, окрашенные трифенилтетразолием хлористым (1%-раствор трифенилтетразолия хлористого в 0.2 М Tris, pH 7.8) [10]. Анализ полученных изображений проводился планиметрическим методом при помощи программы Fiji-ImageJ.

Электрофизиологические эксперименты проводились через две и четыре недели после операции на изолированных сердцах крыс, перфузируемых раствором Тирода по методу Лангендорфа [11]. Регистрация внеклеточных потенциалов действия (ВПД) осуществлялась от поверхности левого желудочка (ЛЖ) с помощью микроэлектрода.

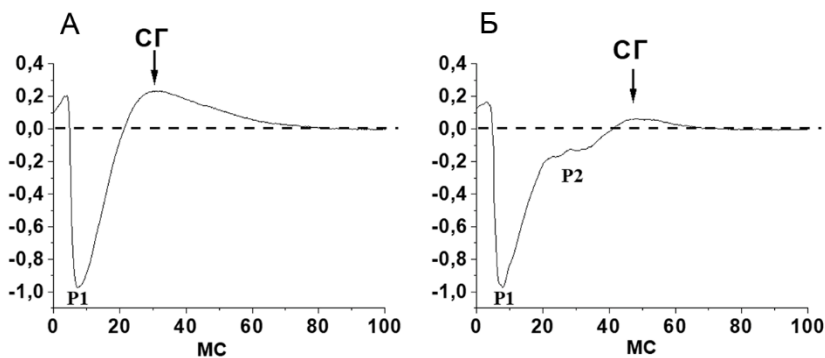
Морфологические изменения Т-системы кардиомиоцитов субэпикарда исследовали с помощью конфокальной микроскопии (микроскоп Leica TCS SP5) [12]. Изолированное сердце, окрашенное с

помощь. перфузии Di-8-ANEPPS и обращенное ЛЖ в сторону объектива микроскопа, располагалось в чашечке Петри с тонким (60 микрон) стеклянным дном. Первичный анализ всех накопленных в этих исследованиях данных производился с помощью программы Fiji-ImageJ.

Полученные данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро-Уилка) и, в соответствии с результатами теста, использовали параметрический или непараметрический тест для оценки достоверности различий.

**Результаты.** Планиметрический метод показал, что средний размер инфаркта ЛЖ у ИР/ХП-крыс (11 крыс) достоверно не отличался от такового у ИР-крыс (11 крыс) ( $13.3 \pm 3.1\%$  и  $17.3 \pm 3.5\%$  соответственно) через две-четыре недели после ИР ( $p > 0.05$ , t-критерий Стьюдента). Это указывает на то, что блокирование сигналов повреждения с помощью ингибирования эндоцитоза не оказало значительного влияния на размеры некротической зоны.

Электрофизиологические исследования показали, что и у ЛО-крыс (5 крыс), и у ИР-крыс через две недели (3 крысы) и четыре недели (4 крысы) после операции профили ВПД представляли два типа сигналов: сигналы первого типа (с одним негативным пиком и быстрой фазой спада – ВПД1) и второго типа (с первым быстрым и вторым, более вариабельным по амплитуде и длительности пиком – ВПД2) (рис. 1).

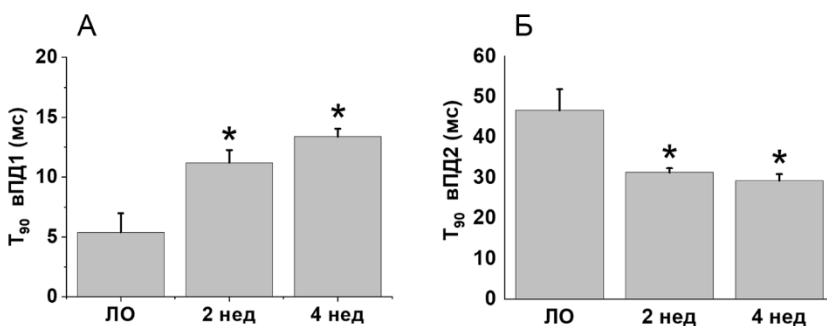


**Рис. 1.** Примеры нормализованных профилей ВПД1 (А) и ВПД2 (Б) субэпикарда ЛЖ у ИР-крысы (четыре недели после операции). СГ – следовая гиперполяризация; P1 – единственный негативный пик ВПД1 и первый негативный пик ВПД2; P2 – второй негативный пик ВПД2.



Параметры вПД кардиомиоцитов крыс после ИР значительно отличались от параметров вПД ЛО-крыс. Как через две, так и через четыре недели после ИР отмечалось увеличение длительности фазы спада ( $T_{90}$ ) вПД1 в сравнении с вПД1 ЛО-крыс (рис. 2А). При этом в группе ИР-крыс у вПД1 появлялась позитивная фаза следовой гиперполяризации (СГ). Профили вПД2 крыс после ИР также претерпевали ряд изменений: отмечалось снижение амплитуды второго пика, к четвертой неделе появлялась фаза СГ, снижалась длительность фазы спады ( $T_{90}$ ) вПД2 (рис. 2Б). Частота встречаемости вПД1 и вПД2 у ИР-крыс не отличалась от распределения соответствующих типов вПД у ЛО-крыс.

В отличие от параметров вПД ИР-крыс, аналогичные характеристики вПД ИР/ХП-крыс не показали достоверных отличий от вПД ЛО-крыс ни через две недели (7 крыс), ни через четыре недели (6 крыс) после операции. Не было показано изменения длительности фазы спада вПД1 и вПД2 ИР/ХП-крыс в сравнении с ЛО-группой. Также не отмечалось изменения амплитуды второго пика вПД2.



**Рис. 2.** Длительность фазы спада ( $T_{90}$ ) вПД1 (А) и вПД2 (Б) кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ ЛО-крыс и ИР-крыс (2 и 4 недели после операции). \* – достоверное отличие от ЛО-крыс ( $p < 0.05$ , анализ Краскела-Уоллиса с тестом Данна).

При исследовании морфологических изменений Т-системы через четыре недели после ИР производилась оценка длины интервалов между соседними t-трубочками, а также подсчитывалась доля интервалов, превышающих в длину 3 мкм, поскольку многие патологии миокарда сопровождаются снижением плотности расположения t-трубочек. В наших экспериментах длина интервалов между соседними рядами t-трубочек не отличалась достоверно между экспериментальными группами:  $2.04 \pm 0.08$  мкм в ЛО-группе (3 крысы),  $1.87 \pm 0.19$  мкм в ИР-группе (3 крысы) и  $1.85 \pm 0.04$  мкм в ИР/ХП-группе (4 крысы). Также

не было показано различия в долях длинных интервалов: они составляли  $14.5 \pm 0.7\%$ ,  $11.92 \pm 2.5\%$  и  $11.4 \pm 1.3\%$  у ЛО-, ИР- и ИР/ХП-крыс соответственно ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA).

Ранее нами было показано, что регистрация одного из двух типов ВПД обусловлена расположением кончика микроэлектрода относительно устьев t-трубочек на поверхности кардиомиоцита, а изменение в частоте встречаемости ВПД1 и ВПД2 может быть связано с ремоделированием Т-системы [11-13]

В данной работе изменений в организации Т-системы показано не было, что согласуется с данными, указывающими на отсутствие различий в соотношении двух типов ВПД в разных экспериментальных группах. Также не показано достоверного отличия между долей рубцовой ткани в ИР- и ИР/ХП-группе. Однако изменения профилей ВПД, встречавшиеся после ИР, не были отмечены у животных ИР/ХП-группы. Таким образом, можно предположить, что частичное подавление эндоцитоза существенно не влияет на размеры некротической зоны, но может препятствовать ремоделированию электрогенеза в плазматической мембране кардиомиоцитов субэпикарда.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00 и при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-34-90010.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Frantz S., Hundertmark M.J., Schulz-Menger J. et al. // Eur. Heart J. 2022. 43(27): 2549-61.
2. Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E. et al. // Nature. 2014. 515(7527): 431-5.
3. Liu S.Q., Tefft B.J., Zhang D. et al. // Mol. Cell Biomech. 2011. 8(4): 319-38.
4. Suzuki J., Ogawa M., Watanabe R. et al. // Int. Heart J. 2011. 52(5): 266-9.
5. Oyamada S., Bianchi C., Takai S. et al. // Basic Res. Cardiol. 2010. 105(4): 513-22.
6. Kawaguchi M., Takahashi M., Hata T. et al. // Circulation. 2011. 123(6): 594-604.
7. Khaidakov M., Mercanti F., Wang X. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2014. 306(12): H1700-07.
8. Li G., Shen F., Fan Z. et al. // Mol. Neurobiol. 2017. 54(9): 7471-82.
9. Gao D., Zhang L., Dhillon R. et al. // PLoS ONE. 2013. 8(4): e60967.
10. Fishbein M.C., Meerbaum S., Rit J. et al. // Am. Heart J. 1981. 101(5): 593-600.
11. Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D. et al. // Front. Physiol. 2018. 9: 61.
12. Kubasov I.V., Bobkov D.E., Stepanov A.V. et al. // Russian Journal of Physiology. 2020. 106(9): 1098-108.
13. Кубасов И.В., Степанов А.В., Панов А.А. и др. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2021. 107(12): 1583-96.

# ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК

*Шардина К.Ю.<sup>1</sup>, Тимганова В.П.<sup>1</sup>, Бочкова М.С.<sup>1,2</sup>,  
Ужвийок С.В.<sup>1</sup>, Заморина С.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

**Введение.** Миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) – особая популяция клеток врожденного звена иммунитета, обладающая мощным регуляторным потенциалом. MDSC подразделяют на две основные субпопуляции: гранулоцитарные (PMN-MDSC, G-MDSC, CD33<sup>low</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14 – CD15<sup>+</sup>/CD66b<sup>+</sup>-клетки), и моноцитарные (M-MDSC, CD33<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-/low</sup> CD15<sup>-</sup>/CD66b<sup>-</sup>-клетки). MDSC, используя широкий спектр механизмов, способны подавлять иммунный ответ при многих патологических состояниях, таких как аутоиммунные расстройства, онкологические заболевания, сепсис, а также при непатологических – при беременности. Одним из механизмов подавления у MDSC является истощение триптофана и аргиназы в месте иммунного ответа. Для этого MDSC вырабатывают ферменты: индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO) и аргиназу (Arg 1) [1,2]. На сегодняшний день известно, что индукция MDSC играет важное значение в поддержании иммунной толерантности к плоду [3]. Поскольку формирование иммунной толерантности не ограничивается клетками и тканями, одним из подходов изучения этого феномена является исследование регуляторного континуума, формируемого протеиновым профилем. Одним из важнейших белков, возникающих при беременности, является хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). ХГЧ – гликопротеин, синтез которого достигает максимума на 9-11 неделе беременности, а затем снижается и держится на одном уровне вплоть до родов. ХГЧ участвует в основных репродуктивных процессах [4]. Помимо прямых функций, направленных на рост и развитие плода, ХГЧ проявляет разносторонние иммуномодулирующие эффекты [5].

**Цель работы** – изучить влияние ХГЧ на дифференцировку MDSC с оценкой субпопуляций M-MDSC, PMN-MDSC, а также функциональную активность клеток посредством измерения внутриклеточного уровня ферментов Arg 1, IDO и оценки цитокинового профиля культуры.

**Материалы и методы.** Исследование было проведено согласно Хельсинской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 18.08.2020.

**Объекты исследования.** В работе были использованы мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) условно здоровых доноров ( $n = 7$ ). МПК получали центрифугированием на градиенте плотности ( $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ , DiaColl, ДиаМ, Россия). Из МПК крови доноров методом иммуномагнитной сепарации выделяли CD11b<sup>+</sup> – клетки, для чего использовали магнитные сферы MacsBeads с антителами к молекуле CD11b и разделительную колонку MS («MiltenyiBiotec», Германия).

ХГЧ (Овирель, Израиль) добавляли в культуру клеток в физиологических концентрациях, соответствующих таковым во время беременности – 10 и 100 МЕ/мл.

**Схема культивирования.** Полученные после магнитной сепарации CD11b-клетки засеивали в 96-луночный планшет в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл с добавлением полной питательной среды (RPMI-1640, 10% FBS, 10 mM Hepar («ICN Ph.», США), 2 mM L-глутамин («ICN Ph.», США) и 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, «BI», Израиль)). Для индукции клеток в фенотип MDSC в первый день культивирования вносили GM-CSF («MiltenyiBiotec», Германия) в концентрации 20 нг/мл.

После двух суток культивирования клеток производили индукцию клеток в фенотип MDSC с помощью цитокина IL-1 $\beta$  в концентрации 20 нг/мл («Miltenyi Biotec», Германия) и LPS в концентрации 0.1 мкг/мл (Sigma Aldrich, США). По истечении двух суток производили смену питательной среды. Культивирование клеток осуществлялось в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 суток.

После 7 суток культивирования клетки окрашивали мечеными флуорохромами антителами: HLA-DR-Alexa Fluor 750, anti-CD33-APC, anti-CD11b-Alexa Fluor 405, anti-CD66b-PE, anti-CD14-PerCP, anti-CD19-AF700, anti-CD56-AF700, anti-CD3-AF700 (R&D Systems, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии ферментов Arg 1 и IDO была проведена пермеабелизация клеток с использованием моноклональных антител к IDO (R&D Systems, США) и Arg 1 (R&D Systems, США).

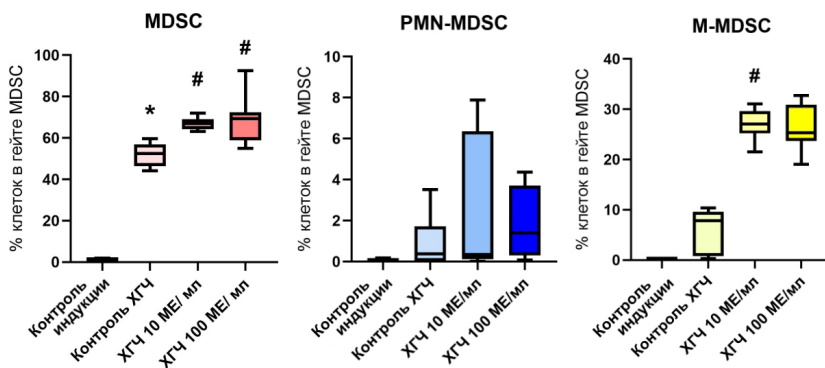
Определение цитокинов производили, используя супернатанты культур с помощью коммерческого набора «Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1 37-plex» (Bio-Rad, США) методом Luminex xMAP.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8. Для сравнения зависимых выборок был использован непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений

– критерий Фридмана. Статистические различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Часть данных представлена в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1-Q3)).

**Результаты и обсуждение. Влияние ХГЧ на дифференцировку MDSC, PMN-MDSC и M-MDSC.** В первую очередь стоит отметить, что по истечении 7 суток культивирования клеток, их жизнеспособность составила 98.13 (94.09-98.84)%. В наших экспериментах выбранные цитокины способны направлять индукцию CD11b-клеток в MDSC, что свидетельствует об адекватности выбранной модели (рис. 1).

Показано, что ХГЧ в обеих концентрациях повышал общий уровень MDSC в культуре (рис. 1). Что касается субпопуляций, то установлено, что ХГЧ (10 МЕ/мл) способен достоверно увеличивать уровень M-MDSC, но не PMN-MDSC. Скорее всего, это связано с тем, что наша экспериментальная модель получения MDSC не способствуют образованию субпопуляции PMN-MDSC. Интересно, что при беременности расширение пула MDSC происходит как раз за счет PMN-MDSC, поэтому нельзя исключать воздействие других факторов.



**Рис. 1.** Влияние ХГЧ на экспрессию маркеров субпопуляций MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC) ( $n = 7$ , Me (Q1-Q3)). **Примечание:** # – достоверные ( $p < 0.05$ ) различия по сравнению с контролем индукции, достоверные ( $p < 0.05$ ) различия по сравнению с контролем ХГЧ с использованием непараметрического критерия Фридмана.

**Влияние ХГЧ на экспрессию ферментов Arg 1 и IDO.** Для определения MDSC важно помнить, что эта клеточная популяция не имеет уникального маркера, поэтому для идентификации MDSC важно учитывать их функциональные характеристики. Один из

иммуносупрессивных механизмов MDSC – синтез ферментов, таких как Arg 1, IDO и индуцибельная NO-синтаза (iNOS). Их действие основано на истощении питательных веществ – аргинина и триптофана в месте иммунного ответа, что приводит к подавлению пролиферации и активности Т-клеток [6,1]. В настоящем исследовании нами был оценен уровень IDO и Arg 1.

В результате проведенного исследования показано, что ХГЧ не влиял на экспрессию Arg 1 (табл. 1). Возможно, это может быть связано с тем, что индукция Arg 1 происходит в противовоспалительном микроокружении, а в отсутствии антигенной стимуляции не происходит синтез аргиназы 1 [7,8].

В отношении экспрессии IDO достоверных эффектов ХГ также не было обнаружено. Однако, мы видим тенденцию к увеличению уровня экспрессии этого фермента почти в два раза под воздействием ХГЧ в концентрации 10 МЕ/мл.

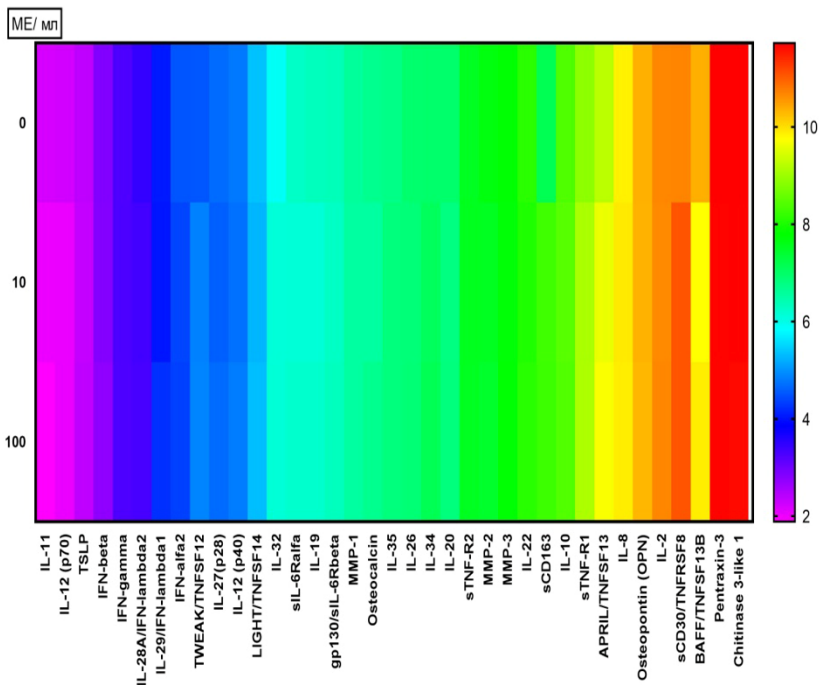
**Табл. 1.** Влияние ХГЧ на внутриклеточную экспрессию Arg 1 и IDO в MDSC в культуре CD11b<sup>+</sup>-клеток после 7-ми суток инкубации (n = 7, Ме (Q1-Q3)).

	<b>Arg 1, %</b>	<b>IDO, %</b>
Контроль индукции	0.150 (0.025-0.447)	0.49 (0.002-0.007)
Контроль ХГЧ	0.920 (0.212-1.538)	7.84 (0.06-0.09)
ХГЧ 10 МЕ/ мл	1.335 (0.39-1.978)	15.11 (0.14-0.15)
ХГЧ 100 МЕ/ мл	0.145 (0.082-0.312)	7.72 (0.06-0.09)

**Примечание:** результаты выражены в проценте от общей популяции MDSC в культуре; для статистического анализа был использован непараметрический критерий Фридмана, в результате достоверных различий (p < 0.05) не обнаружено.

**Влияние ХГЧ на цитокиновый профиль в супернатантах культуры CD11b<sup>+</sup>-клеток.** Иммунные реакции организма опосредованы сигнальными молекулами – цитокинами. Цитокины, обладая различными эффектами, как провоспалительными, так и противовоспалительными, обеспечивают связями различные системы органов между собой.

В нашем исследовании был использован метод мультиплексного анализа цитокинов. В результате проведенного исследования установлено, что достоверного влияния ХГЧ на цитокиновый профиль культуры клеток обнаружено не было (рис. 2).



**Рис. 2.** Тепловая карта эффектов ХГЧ на цитокиновый профиль супернатантов культур. **Примечание:** в построении тепловой карты использованы натуральные логарифмы концентраций цитокинов.

**Заключение.** Таким образом, ХГЧ в условиях направленной индукции CD11b – клеток при помощи провоспалительных цитокинов (GM-CSF и IL-1 $\beta$ ) и LPS способен расширять общий пул MDSC за счет субпопуляции M-MDSC, но не PMN-MDSC. Также показано, что ХГЧ не влиял на функциональный статус MDSC, однако наблюдалась тенденция к увеличению фермента IDO. В целом можно предположить, что ХГЧ расширяет пул MDSC клеток, но не модулирует исследованные нами механизмы супрессии MDSC, а именно истощение аргинина и триптофана в месте иммунного ответа, а также продукцию цитокинов. Тем не менее, полученные данные указывают на регуляторный потенциал ХГЧ в отношении MDSC.

Исследование поддержано проектом РФФИ 19-415-590004 и темой НИР АААА-А19–119112290007-7.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C.* // Blood. 2007. 109(4): 1568-73.
2. *Medzhitov R., Shevach E.M., Trinchieri G. et al.* // Nature Rev. Immunol. 2011. 11(10): 693-702.
3. *Ostrand-Rosenberg S.* // Curr. Opin Immunol. 2018. 51: 68-75.
4. *Paulesu L., Rao C.V., Ietta F. et al.* // IJMS. 2018. 19(3): 914.
5. *Schumacher A., Zenclussen A.C.* // Front. Immunol. 2019. 10: 2896.
6. *Fletcher M., Ramirez M.E., Sierra R.A. et al.* // Cancer Res. 2015. 75(2): 275-83.
7. *Bansal V., Ochoa J.B.* // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2003. 6: 223-8.
8. *Cook P.C., Jones L.H., Jenkins S.J. et al.* // PNAS. 2012. 109. 9977-82.

### ФИЗИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ САМОК КРЫС ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ АРТЕРИЙ ПОЧКИ НОВОРОЖДЕННОГО ПОТОМСТВА

*Швецова А.А.<sup>1</sup>, Борзых А.А.<sup>2</sup>, Кузьмин И.В.<sup>1</sup>, Кирюхина О.О.<sup>3</sup>,  
Селиванова Е.К.<sup>1</sup>, Гайнуллина Д.К.<sup>1</sup>, Тарасова О.С.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>ИППИ им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

**Введение.** Оксид азота (NO) продуцируется сосудистым эндотелием тонически или в ответ на различные воздействия и препятствует вазоконстрикции. Выраженное антиконстрикторное влияние NO в период раннего постнатального онтогенеза способствует поддержанию артериального давления (АД) в незрелой сосудистой системе на низком уровне [1,2]. Функциональный вклад NO в артериях потомства может снижаться в результате неблагоприятных изменений в организме матери во время беременности, таких как гипотиреоз или преэклампсия [3,4].

Регулярную физическую нагрузку рассматривают в качестве профилактики патологий беременности, поскольку она повышает синтез NO в плаценте и может способствовать нормализации плацентарного кровотока [5,6]. Вместе с тем влияние физической активности матери на развитие плода и потомства изучено мало. Ранее мы показали, что физическая тренировка (бег в колесе) положительно влияет на ряд гормональных показателей организма беременных самок, но сопровождается повышением у них уровня АД [7], что может быть неблагоприятно для развития плода [8].



Целью данного исследования стало оценить влияние физической активности матери во время беременности на функциональный вклад NO в сосудистой системе потомства. Объектом исследования служили артерии почки ввиду высокой чувствительности почки плода к изменениям условий внутриутробного развития, в том числе к материнской гипертензии [8,9].

**Материалы и методы.** Физическую тренировку самок крыс проводили в произвольном режиме нагрузки (бег в колесе) с 1 по 20 день беременности с использованием аппаратно-программного комплекса ASPAM, методика и данные о влиянии тренировки на организм самок подробно описаны в статье [7]. Далее в экспериментах использовали потомство в возрасте 14-15 дней.

Регистрацию артериального давления проводили под наркозом (уретан, 1.2 г/кг) через катетер в сонной артерии, фармакологические вещества вводили через катетер в яремной вене [10].

Регистрацию сократительных ответов междолевых артерий почки проводили в изометрическом режиме с использованием системы wire-myograph [10].

Уровни экспрессии мРНК целевых генов в ткани междолевых артерий почки определяли методом ПЦР в реальном времени, данные нормировали на содержание мРНК  $\beta$ -актина в том же образце ткани и выражали в процентах от среднего значения в группе «Контроль» [10].

Концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови определяли с использованием наборов фирмы Ольвекс (Россия), а содержание метаболитов NO - по методу Грисса [10].

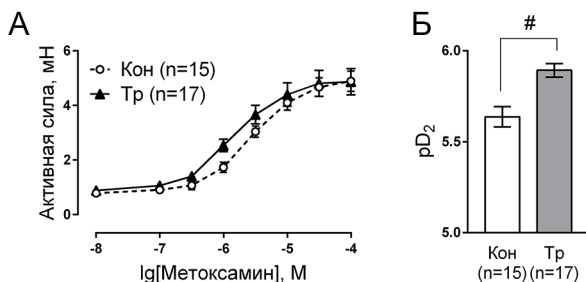
**Результаты и обсуждение.** Бег в колесе во время беременности не оказал влияния на массу тела, а также на показатели гемодинамики потомства в фоне, при ганглиоблокаде и при активации  $\alpha_1$ -адренорецепторов (табл. 1). Кроме того, между двумя группами крысят не наблюдалось отличий по таким показателям, как реакция АД на блокаду синтеза NO и содержание метаболитов NO в крови (табл. 1), что указывает на отсутствие системных изменений функционального вклада NO в результате тренировки матери.

Вместе с тем результаты экспериментов на изолированных междолевых артериях почки демонстрируют изменение сократительных ответов этих артерий у потомства тренированных самок. Хотя между группами «Контроль» и «Тренировка» не было выявлено отличий по внутреннему диаметру артерий ( $213 \pm 5$  мкм и  $206 \pm 6$  мкм, соответственно  $n = 15; 17$ ,  $p > 0.05$ ) и максимальной силе сокращения на метоксамин (рис. 1А), артерии крысят группы «Тренировка» обладали более высокой чувствительностью к метоксамину (рис. 1Б).

**Табл. 1.** Масса тела, показатели системной гемодинамики и биохимические показатели сыворотки крови двух групп крысят.

Показатели	Контроль	Тренировка
Масса тела, г (n = 15; 17)	30 ± 1	31 ± 1
АДср в фоне, мм рт. ст. (n = 9; 13)	52.9 ± 1.4	49.6 ± 0.9
ЧСС в фоне, уд/мин (n = 9; 13)	416 ± 5	434 ± 7
АДср при ганглиоблокаде, мм рт. ст. (n = 9; 13)	28.2 ± 1.6	25.1 ± 0.7
Реакция АДср на метоксамин (50 мкг/кг), мм рт. ст. (n = 9; 11)	9.0 ± 0.8	8.1 ± 0.5
Реакция АДср на L-NAME (10 мг/кг), мм рт. ст. (n = 9; 11)	18.4 ± 1.5	15.9 ± 1.9
Нитриты+нитраты, мкмоль/л (n = 7; 9)	35.9 ± 2.4	36.3 ± 2.8
Креатинин, мкмоль/л (n = 15; 17)	60.3 ± 1.3	59.4 ± 1.2
Мочевина, ммоль/л (n = 15; 17)	4.95 ± 0.29	4.24 ± 0.24

АДср – среднее за цикл АД. Ганглиоблокаду вызывали путем введения хлоризондамина (2.5 мг/кг). Данные представлены в виде среднего ± SEM.

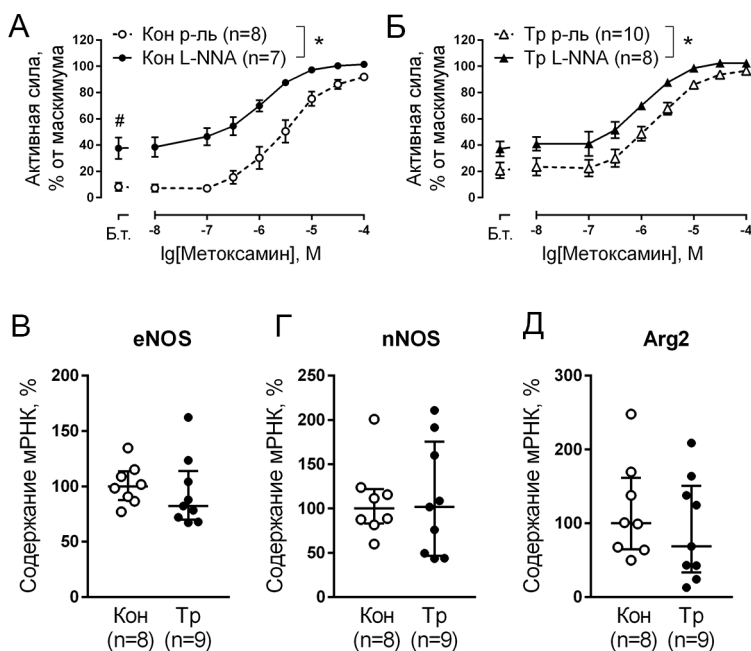


**Рис. 1.** А. Зависимости концентрация-эффект артерий почки крысят групп «Контроль» (Кон) и «Тренировка» (Тр) на метоксамин. Б. Значения  $pD_2$  ( $-lgEC_{50}$  – концентрация метоксamina, вызывающая полумаксимальный ответ). Данные представлены в виде среднего ± SEM. # –  $p < 0.05$  (критерий Стьюдента).

У обеих групп крысят ингибитор NO-синтаз L-NNA значительно усиливал сократительные ответы артерий (рис. 2). Следует отметить, что в артериях потомства тренированных самок эффект L-NNA был менее выраженным: площадь под зависимостью «концентрация метоксamina – эффект» увеличилась в присутствии L-NNA (относительно соответствующего значения в присутствии растворителя) до  $177 \pm 9\%$  в группе «Контроль» и лишь до  $131 \pm 6\%$  в группе «Тренировка» ( $p < 0.05$ ).

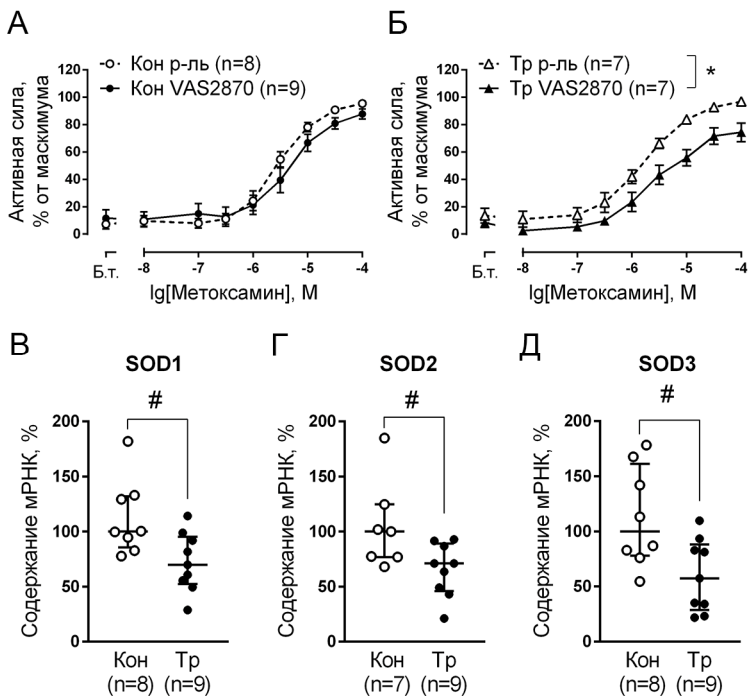
Реакции артерий на донор оксида азота DEA-NO не различались между группами (диапазон концентраций 0.01 мкМ – 10 мкМ, данные не представлены), что говорит о схожей чувствительности гладкой мышцы к NO у двух групп крысят.

Степень проявления антиконстрикторного влияния NO может коррелировать с уровнем экспрессии ферментов, принимающих участие в его синтезе [1,2]. Однако в данном эксперименте содержание мРНК генов, кодирующих конститутивные изоформы NO-синтазы (эндотелиальная (eNOS) и нейрональная (nNOS)), не различалось между группами «Контроль» и «Тренировка» (рис. 2В-Г). Экспрессия мРНК аргиназы 2, которая конкурирует с NO-синтазами за субстрат L-аргинин, также не различалась у двух групп (рис. 2Д).



**Рис. 2.** А, Б. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин артерий почки двухнедельных крысят групп «Контроль» (А) и «Тренировка» (Б) в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NNA (100 мкМ) или его растворителя (H<sub>2</sub>O, 50 мкл на 5 мл камеры миографа); \* – p < 0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ). Б. т. – базальный тонус (значение силы сокращения до добавления первой концентрации метоксамина); # – p < 0.05 (критерий Стьюдента). Данные представлены в виде среднего ± SEM. В-Д Относительное содержание мРНК изоформ NO-синтазы (В, Г) и аргиназы-2 (Д) в артериях почки двух групп крысят. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

Таким образом, снижение антиконстрикторного влияния NO в междолевых артериях почки крысят группы «Тренировка» не связано ни с изменением чувствительности гладкой мышцы к NO, ни с изменением экспрессии генов ферментов, участвующих в его синтезе. Следует отметить, что при одинаковой скорости синтеза в эндотелии влияние NO на тонус сосудов может быть уменьшенным в результате повышенной деградации в сосудистой стенке.



**Рис. 3.** А, Б. Зависимости «концентрация-эффект» на метоксамин междолевых артерий почки двухнедельных крысят групп «Контроль» (А) и «Тренировка» (Б) в присутствии ингибитора NADPH-оксидаз VAS2870 (1 мкМ) или его растворителя (DMSO, 5 мкл на 5 мл камеры миографа); \* –  $p < 0.05$  (двухфакторный дисперсионный анализ). Б. т. – базальный тонус. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM. В-Д. Относительное содержание изоформ супероксиддисмутазы в артериях почки двух групп крысят. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; # –  $p < 0.05$  (критерий Манна-Уитни).

Известно, что биодоступность NO может снижаться в результате взаимодействия с активными формами кислорода (АФК), а именно с супероксидным анион-радикалом ( $O_2^-$ ), в результате чего образуется пероксинитрит [11]. Ферменты NADPH-оксидазы играют ключевую роль

в продукции АФК в стенке артерий [12], причем образуемые ими АФК могут вызывать сокращение гладкомышечных клеток [12]. В наших экспериментах ингибитор NADPH-оксидазы VAS2870 не изменял вызванные метоксамином сократительные реакции артерий в группе «Контроль» (рис. 3А), но значительно снижал их в группе «Тренировка» (рис. 3Б), что указывает на усиление вазоконстрикторного влияния продуцируемых NADPH-оксидазами АФК при тренировке матери.

Содержание мРНК каталитических субъединиц двух наиболее представленных в артериях изоформ NADPH-оксидазы (NOX2 и NOX4) не различалось между двумя группами крысят (данные не представлены). Однако в артериях крысят группы «Тренировка» выявлено снижение экспрессии всех трех изоформ супероксиддисмутазы (рис. 3В-Д), которые преобразуют  $O_2^-$  в менее реакционноспособный и более стабильный  $H_2O_2$ , что предполагает повышенное содержание  $O_2^-$  в стенке артерий крысят группы «Тренировка».

**Заключение.** Таким образом, физическая активность матери во время беременности не оказывает влияния на регуляцию системной гемодинамики, но приводит к подавлению антиконстрикторного влияния NO в междольевых артериях почки потомства. Мы полагаем, что последнее связано со снижением биодоступности NO, одной из причин которого может быть повышение содержания  $O_2^-$  в стенке артерий почки потомства группы «Тренировка». Отсутствие изменений содержания креатинина и мочевины в плазме (табл. 1) предполагает, что в первые две недели жизни сдвиг механизмов регуляции тонуса междольевых артерий почки в сторону преобладания констрикторных влияний не оказывает существенного влияния на экскреторную функцию почки у крысят группы «Тренировка». Вместе с тем выявленные нами особенности реактивности почечных артерий могут служить фактором риска развития патологий почки на более поздних этапах постнатального онтогенеза.

Исследование проведено при поддержке РФФИ (проект № 23-25-00056).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sofronova S.I. et al. // Nitric Oxide. Elsevier Inc, 2016. 55-56: 1-9.
2. Gaynullina D. et al. // Cardiovasc. Res. 2013. 99(4): 612-21.
3. Sofronova S.I. et al. // J. Endocrinol. 2017. 235(2): 137-51.
4. Shvetsova A.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(15): 8003.
5. Gilbert J.S. et al. // Hypertension. 2012. 60(6): 1545-51.
6. Ramírez-Vélez R. et al. // PLoS One. 2013. 8(11).
7. Borzykh A.A. et al. // Aviakosmicheskaya i Ekol. Meditsina. 2020. 54(2): 89-95.
8. Pezeshki Z., Eshraghi-Jazi F., Nematbakhsh M. // Int. J. Vasc. Med. Hindawi Publishing Corporation, 2014. 2014.
9. Paixão A.D., Alexander B.T. // Biol. Reprod. 2013. 89(6): 1-10.
10. Selivanova E.K. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(22).
11. Shaito A. et al. // Front. Biosci. - Landmark. 2022. 27(3).
12. Bedard K., Krause K.H. // Physiol. Rev. 2007. 87(1) :245-313.

## КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

### КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ И КАЛЬЦИЙ-СЕНСОРНЫЕ БЕЛКИ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКЗО-ЭНДОЦИТОЗА ВЕЗИКУЛ

*Нуруллин Л.Ф., Алмазов Н.Д., Волков Е.М.*

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Потенциал действия вызывает приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму через потенциал-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы. Это запускает слияние синаптических везикул, содержащих нейротрансмиттер, с плазматической мембраной. Стадия слияния катализируется комплексом трех белков SNARE: везикулярным SNARE (v-SNARE) на синаптических везикулах и гетеродимером таргетных мембранных белков SNARE (t-SNARE) на плазматической мембране [1]. Синаптотагмин 1, трансмембранный белок синаптических везикул, который связывает ионы  $\text{Ca}^{2+}$  посредством тандемных C2-доменов, названных C2A и C2B, передает  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительность в SNARE-опосредованном слиянии везикул с мембраной [2]. В нейронах синаптотагмин 1 связывает вход  $\text{Ca}^{2+}$  с синхронным освобождением синаптических везикул [3]. В отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  цитоплазматический домен синаптотагмина 1 замедляет скорость SNARE-опосредованного слияния везикул с мембраной и увеличивает частоту спонтанного освобождения нейромедиатора [4]. Синаптотагмин-1 действует не только как ключевой сенсор для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в процессе быстрого синхронного экзоцитоза синаптических везикул, но он также участвует в эндоцитозе синаптических везикул [5]. Биохимические эксперименты продемонстрировали, что синаптотагмин 1 взаимодействует с адаптерным белком клатрина (AP-2), предполагая роль синаптотагмина 1 в клатрин-опосредованном эндоцитозе и связывая таким образом слияние синаптических везикул с их восстановлением [6]. В нервно-мышечном соединении *Drosophila* острая инактивация функции синаптотагмина 1 также вызывает нарушение эндоцитоза синаптических пузырьков [7]. В хромаффинных клетках надпочечников эндоцитоз в отсутствие синаптотагмина 1, переключается с  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого на  $\text{Ca}^{2+}$ -независимый механизм [8]. Помимо синаптотагмина 1, существуют 14 других синаптотагминов, которые имеют одинаковую общую структуру домена, но различаются паттернами экспрессии и биохимическими свойствами. Среди «других» синаптотагминов синаптотагмин 2 наиболее близко напоминает синаптотагмин 1 и является единственным синаптотагмином, помимо синаптотагмина 1, который однозначно

локализован в синаптических пузырьках [3]. Синаптотагмины 1 и 2 оба связываются с белками SNARE и фосфолипидами  $Ca^{2+}$ -зависимым образом [9]. Эти данные предполагают, что синаптотагмины 1 и 2 выполняют сходные функции. Синаптотагмин 2 восстанавливает фенотип дефицита синаптотагмина 1 в нейронах и хромаффинных клетках [10]. Синаптотагмин 2, но не синаптотагмин 1, избирательно связывается с инозитолполифосфатазой [11]. Синаптотагмин 7 ключевой  $Ca^{2+}$ -чувствительный синаптический белок, который поддерживает асинхронный выброс нейротрансмиттера независимо от синаптотагмина 1 [12]. В то время как синаптотагмин 1 является ключевым сенсором для вызванного освобождения нейротрансмиттера, альтернативный белок, содержащий C2-домен, Doc2b, был идентифицирован как сенсор  $Ca^{2+}$  для спонтанного освобождения нейротрансмиттера [13]. Как и синаптотагмин, Doc2b, по-видимому, функционирует посредством взаимодействия с комплексами SNARE [14]. На хромаффинных клетках показано, что Doc2b действует как  $Ca^{2+}$  сенсор для прайминга везикул, участвуя в перемещении везикул в готовый к освобождению пул, при это требуется взаимодействие с ионами  $Ca^{2+}$ , белком *ubMunc13-2* и SNARE комплексом в присутствии синаптотагмина 1 [15].

Кальмодулин – это повсеместно экспрессируемый  $Ca^{2+}$ -связывающий белок, который может связывать четыре иона  $Ca^{2+}$  через свои четыре EF-домены [16]. Это высококонсервативный белок, обнаруживаемый у всех эукариот и на 100% идентичен по аминокислотному составу у всех позвоночных. Он участвует в регуляции многих важных физиологических процессов, включая подвижность клеток, экзоцитоз, сборку цитоскелета и модуляцию внутриклеточных концентраций  $Ca^{2+}$  [17]. Одной из функций кальмодулина является регулирование активности потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов путем связывания с субъединицами каналов [18].  $Ca^{2+}$ -кальмодулин, связываясь с потенциал-зависимыми  $Ca^{2+}$  каналами, может иметь ряд эффектов на функцию каналов, включая  $Ca^{2+}$ -зависимое облегчение или инактивацию [19]. Два других основных механизма действия кальмодулина осуществляются косвенно через его целевые белки  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимые киназы (CaMKs) и кальциневрин. CaMKs вносят вклад в ряд регуляторных путей [20]. Кальмодулин также положительно регулирует вероятность пресинаптического освобождения, и это опосредуется активацией CaMKII [21].

$Ca^{2+}$ -активируемая фосфатаза кальциневрин может дефосфорилировать широкий спектр нейрональных белков, приводя к прямым эффектам и эффектам через изменения транскрипции генов. Кроме того, кальциневрин участвует в механизмах синаптической пластичности [22].

В то время как кальмодулин экспрессируется повсеместно, экспрессия других белков, чувствительных к  $\text{Ca}^{2+}$ , может быть ограничена определенными тканями и типами клеток. Хорошим примером этого является семейство белков нейронального сенсора  $\text{Ca}^{2+}$  (NCS), которые экспрессируются в нейронах и фоторецепторах сетчатки. Члены семейства белков NCS участвуют в регуляции освобождения нейротрансмиттеров, регуляции рецепторов на клеточной поверхности и ионных каналов, контроля транскрипции генов, роста клеток [23].

Сигналы  $\text{Ca}^{2+}$  генерируются либо входом  $\text{Ca}^{2+}$  через поверхностную мембрану, либо освобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$  хранилищ, таких как эндоплазматический ретикулум. Вход  $\text{Ca}^{2+}$  через поверхностную мембрану опосредуется  $\text{Ca}^{2+}$  каналами L, P/Q, N, R, T-типов, в то время как вход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных хранилищ опосредуется рианодиновыми рецепторами, или каналами инозитолтрифосфатных рецепторов (IP3R) [24]. Освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума участвует в модуляции постсинаптических ответов и синаптической пластичности [25]. В терминалях аксонов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо участвует в слиянии пузырьков и освобождении нейромедиаторов [26]. В соме нейронов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительные сигнальные пути, связанные с активностью киназ и фосфатаз [27]. Рианодиновые рецепторы активируются механизмом  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  в результате деполяризации мембраны [28]. Существует тесная функциональная связь между рианодиновыми рецепторами и  $\text{Ca}^{2+}$  каналами L-типа в нейронах [29].  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  инициируется притоком  $\text{Ca}^{2+}$ , который поступает через мембранные  $\text{Ca}^{2+}$  каналы [30]. В двигательных нервных терминалях лягушки активирование  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  усиливает асинхронное освобождение медиатора [31]. Инозитолтрифосфатные рецепторы 1 играют ключевую роль в усилении патологического повышения  $\text{Ca}^{2+}$ , возникающего в результате чрезмерной холинергической активности [32]. Активность инозитолтрифосфатных рецепторов 1 регулирует экспрессию ацетилхолинового рецептора и пресинаптический везикулярный трафикинг в нервно-мышечном соединении. siRNA-опосредованное подавление инозитолтрифосфатных рецепторов 1 в мышцах мышей эффективно увеличивает пресинаптическую нервно-мышечную передачу за счет увеличения частоты миниатюрных токов концевой пластинки и квантового состава [33].

Предполагается, что во время экзоцитоза синаптических везикул потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы временно входят в состав мембраны везикулы и таким образом запускают эндоцитоз. Потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$  каналы, в том числе P/Q-тип  $\text{Ca}^{2+}$  канала обеспечивают вход  $\text{Ca}^{2+}$  и запускают быстрый и медленный эндоцитоз, и таким образом происходит



сопряжение эндоцитоза с экзоцитозом [34]. Каналы N-типа и P/Q-типа являются основными  $\text{Ca}^{2+}$  каналами в нервных окончаниях и играют важную роль в тонкой настройке быстрого освобождения нейромедиаторов в синаптических окончаниях [35].  $\text{Ca}^{2+}$  каналы R-типа присутствуют в периферической и центральной нервной системе. Хотя каналы R-типа не являются основными  $\text{Ca}^{2+}$  каналами, но они также участвуют в пресинаптической пластичности и освобождении нейротрансмиттеров [36]. Канал T-типа, присутствующий в периферических, центральных синапсах и нейроэндокринных клетках, играет ключевую роль в базальной нейросекреции при легкой стимуляции и небольших изменениях потенциала покоя [37].

Таким образом, изучение молекулярных механизмов регуляции экзо-эндоцитозного цикла при участии  $\text{Ca}^{2+}$  каналов и  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорных белков в основном проводилось на представителях классов млекопитающих, амфибий и насекомых, имеющих высокоразвитую нервно-мышечную систему. В то же время исследования на объектах, имеющих эволюционно-первичную двигательную мускулатуру, представлены крайне незначительно, не носят комплексного и сравнительного характера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00239).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Söllner T., Whiteheart S.W., Brunner M. // *Nature*. 1993. 362(6418): 318-24.
2. Tucker W.C., Weber T., Chapman E.R. // *Science*. 2004. 304(5669): 435-8.
3. Geppert M., Goda Y., Hammer R.E. et al. // *Cell*. 1994. 79(4): 717-27.
4. Chicka M.C., Hui E., Liu H., Chapman E.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. 15(8): 827-35.
5. Südhof T.C. // *Nat. Med.* 2013. 19(10): 1227-31.
6. von Poser C., Südhof T.C. // *Eur. J. Cell Biol.* 2001. 80(1): 41-7.
7. Poskanzer K.E., Marek K.W., Sweeney S.T., Davis G.W. // *Nature*. 2003. 426(6966): 559-63.
8. Yao J., Kwon S.E., Gaffaney J.D. et al. // *Nat. Neurosci.* 2011. 15(2): 243-9.
9. Guan Z., Quiñones-Frias M.C., Akbergenova Y., Littleton J.T. // *Elife*. 2020. 9: e55443.
10. Nagy G., Kim J.H., Pang Z.P. et al. // *J. Neurosci.* 2006. 26(2): 632-43.
11. Mehrotra B., Myszka D.G., Prestwich G.D. // *Biochemistry*. 2000. 39(32): 9679-86.
12. Jackman S.L., Turecek J., Belinsky J.E., Regehr W.G. // *Nature*. 2016. 529(7584): 88-91.
13. Groffen A.J., Martens S., Díez Arazola R. et al. // *Science*. 2010. 327(5973): 1614-8.
14. McCue H.V., Haynes L.P., Burgoyne R.D. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. 2(8): a004085.
15. Houy S., Groffen A.J., Ziolkiewicz I. et al. // *Elife*. 2017. 6: e27000.

16. Chattopadhyaya R., Meador W.E., Means A.R., Quijcho F.A. // J. Mol. Biol. 1992. 228(4): 1177-92.
17. Tadross M.R., Dick I.E., Yue D.T. // Cell. 2008. 133(7): 1228-40.
18. Catterall W.A., Few A.P. // Neuron. 2008. 59(6): 882-901.
19. Liu Z., Vogel H.J. // Front. Mol. Neurosci. 2012. 5: 38.
20. Deisseroth K., Heist E.K., Tsien R.W. // Nature. 1998. 392(6672): 198-202.
21. Pang Z.P., Cao P., Xu W., Südhof T.C. // J. Neurosci. 2010. 30(11): 4132-42.
22. Xia Z., Storm D.R. // Nat. Rev. Neurosci. 2005. 6(4): 267-76.
23. Burgoyne R.D., Haynes L.P. // Mol. Brain. 2012. 5(1): 2.
24. Gillespie D., Fill M. // Biophys. J. 2008. 95(8): 3706-14.
25. Holbro N., Grunditz A., Oertner T.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. 106(35): 15055-60.
26. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. // Neuron. 2001. 29(1): 197-208.
27. Berridge M.J. // Neuron. 1998. 21(1): 13-26.
28. Verkhratsky A. // Physiol. Rev. 2005. 85(1): 201-79.
29. Chavis P., Fagni L., Lansman J.B., Bockaert J. // Nature. 1996. 382(6593): 719-22.
30. Gant J.C., Blalock E.M., Chen K.C. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2014. 739: 74-82.
31. Narita K., Akita T., Hachisuka J. et al. // J. Gen. Physiol. 2000. 115(4): 519-32.
32. Zhu H., Bhattacharyya B.J., Lin H., Gomez C.M. // J. Neurosci. 2011. 31(43): 15269-83.
33. Zhu H., Gomez C.M. // Channels (Austin). 2012. 6(1): 65-8.
34. Xue L., Zhang Z., McNeil B.D. et al. // Cell Rep. 2012. 1(6): 632-8.
35. Ariel P., Hoppa M.B., Ryan T.A. // Front. Synaptic Neurosci. 2013. 4: 9.
36. Naidoo V., Dai X., Galligan J.J. // Neurogastroenterol. Motil. 2010. 22(12): e353-63.
37. Lambert R.C., Bessaïh T., Crunelli V., Leresche N. // Pflugers Arch. 2014. 466(3): 415-23.

## ИНСУЛИН АКТИВИРУЕТ КАЛЬЦИЕВУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ОТ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОГО ДОНОРА

*Бондарев А.Д., Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.*

Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Патологическое ожирение характеризуется дисфункцией жировой ткани вследствие гипертрофии зрелых адипоцитов и инсулиновой резистентностью (ИР) [1,2]. Экспансия жировой ткани за счёт формирования новых адипоцитов (гиперплазия) может компенсировать метаболическую дисфункцию и признаётся в литературе как перспективная мишень для лечения метаболического синдрома (MetS) [3].

ЖТ является гетерогенным органом, содержащим популяцию постнатальных стволовых клеток, обеспечивающих её обновление, мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) [4]. Для реализации всей полноты регулируемого терапевтического потенциала МСК, в частности их способности к самообновлению, необходимо глубокое понимание фундаментальных аспектов биологии данных клеток, а именно сигнальных механизмов направления в дифференцировку.

В условиях *in vitro*, адипогенная дифференцировка МСК индуцируется инсулином [4]. Инсулин модулирует адипогенез главным образом подавлением транскрипционной активности FOXO1 через его фосфорилирование серин/треониновой протеинкиназой В (PKB/Akt) [5]. На молекулярном уровне, ИР характеризуется снижением или полным подавлением инсулин-зависимой активации сигнального пути PI3K-Akt [6]; часто происходит также подавление MAP-киназного сигнального пути Ras-Erk1/2. При развитии МетС, характеризующем ИР, изменения в экспрессии мРНК компонентов инсулиновой сигнализации наблюдаются не только в классических инсулин-чувствительных тканях, но и в МСК жировой ткани [7]. Старение МСК приводит к развитию ИР клеток посредством изменения профиля микроРНК, содержащихся в образуемых этими клетками внеклеточных везикулах [8,9].

В инсулиновой сигнализации немаловажную роль играет вторичный посредник кальций ( $Ca^{2+}$ ), но его роль обычно рассматривается как вторичная. В адипоцитах внутриклеточный  $Ca^{2+}$ , мобилизующийся при поведении инсулин-зависимого сигнала, опосредует активацию  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназы-II и вызывает транслокацию GLUT-4 в адипоцитах [10]. Кроме того, инсулин вызывает секрецию лептина  $Ca^{2+}$ -зависимым образом [11]. В МСК, в частности в контексте ИР, об особенностях инсулин-зависимой  $Ca^{2+}$  сигнализации на данный момент известно крайне мало.

МСК проявляют целый ряд специфических механизмов регуляции  $Ca^{2+}$ -зависимой внутриклеточной сигнализации, регулирующей их адипогенную дифференцировку [12,13]. Так, формат  $Ca^{2+}$  ответа, опосредованного ангиотензиновым рецептором 1 типа, в высокой степени коррелирует с эффективностью адипогенной дифференцировки. МСК, реагирующие на ангиотензин II одиночными транзиторными  $Ca^{2+}$  ответами, обладают значительно более низким адипогенным потенциалом по сравнению с МСК, способными генерировать множественные  $Ca^{2+}$  ответы на этот гормон [14,15].

В настоящей работе мы поставили цель изучить влияние инсулина на  $Ca^{2+}$  сигнализацию в состоянии ИР в МСК жировой ткани человека в сравнении с клетками, полученными от здорового донора.

**Методы.** Используя метод прижизненной флуоресцентной микроскопии, мы провели серию экспериментов по регистрации  $\text{Ca}^{2+}$  ответа на инсулин в МСК жировой ткани молодых здоровых и ИР доноров. Для визуализации изменений в концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  использовали флуоресцентный  $\text{Ca}^{2+}$  краситель Fluo-8.

**Результаты.** Мы выявили, что МСК жировой ткани отвечают на инсулин транзиторным приростом цитоплазматического уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Процент отвечающих клеток у МСК ИР донора оказался значительно выше, чем у клеток молодого здорового донора. По типу  $\text{Ca}^{2+}$  ответов, клетки ИР доноров отвечают преимущественно осцилляциями. Клетки молодых здоровых доноров отвечают преимущественно одиночным низкоамплитудным приростом  $\text{Ca}^{2+}$ . На поздних пассажах МСК ИР доноров характеризуются снижением пропорции осцилляций, что может быть связано с приобретением клеток сенесцентного фенотипа.

**Выводы.** Таким образом, мы показали, что состояние ИР характеризуется усилением  $\text{Ca}^{2+}$  ответа в МСК жировой ткани.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова А.В., Кулебякин К.Ю., Кочегура Т.Н. и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. 2019. 74(1): 44-53.
2. Harvey I., Boudreau A., Stephens J.M. // Open Biol. 2020. 10(12): 200291.
3. Ghaben A.L., Scherer P.E. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. 20(4): 242-58.
4. Si Z., Wang X., Sun C. et al. // Biomed. Pharmacother. 2019. 114: 108765.
5. Nakae J., Kitamura T., Kitamura Y. et al. // Dev. Cell. 2003. 4(1): 119-29.
6. James D.E., Stöckli J., Birnbaum M.J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021. 22(11): 751-71.
7. Conley S.M., Zhu X.Y., Eirin A. et al. // Gene. 2018. 644: 101-6.
8. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Efimenko A. et al. // Front. Cell Dev. Biol. 2021. 9: 662078.
9. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O. et al. // Front. Cell Dev. Biol. 2022. 10: 1050489.
10. Yip M.F., Ramm G., Larance M. et al. // Cell Metab. 2008. 8(5): 384-98.
11. Wang Y., Ali Y., Lim C.Y. et al. // Biochem. J. 2014. 458(3): 491-8.
12. Тюрин-Кузьмин П., Молчанов А., Чечехин В. и др. // Биохимия. 2020. 85(3): 307-23.
13. Чечехин В., Кулебякин К., Тюрин-Кузьмин П. // Онтогенез. 2022. 53(3): 163-72.
14. Syssoeva V.Y., Ageeva L.V., Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // Stem Cell Res. 2017. 25: 115-22.
15. Tyurin-Kuzmin P.A., Kalinina N.I., Kulebyakin K.Y. et al. // FEBS J. 2020. 287(6): 1076-87.

# СТЕПЕНЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ЗАПАСА ОПРЕДЕЛЯЕТ ОТВЕТЫ ЦИТОЗОЛЬНОГО $\text{Ca}^{2+}$ НА ПОВТОРНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ КЛЕТОК НЕК-293

*Каймачников Н.П., Соколов В.В., Колесников С.С.*

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
Пушино, Россия

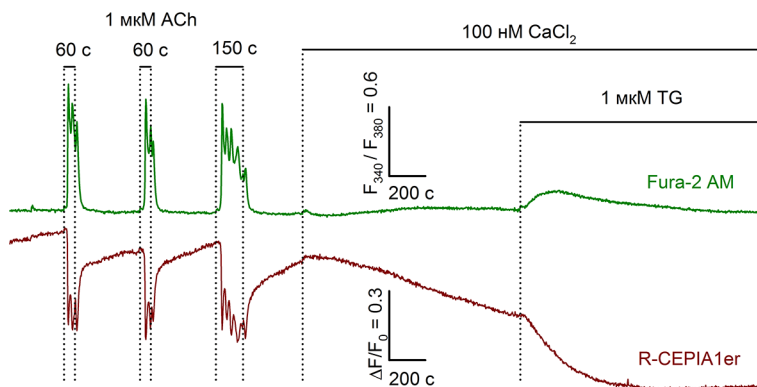
**Введение.** Активация сигнального пути с образованием инозитол-1,4,5-трисфосфата ( $\text{IP}_3$ ) приводит к кратковременному повышению концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), которое может повторяться в виде колебаний. Изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  контролируют многочисленные процессы, причем в ряде случаев установлено, что эффект зависит от временных характеристик сигнала [1]. Различные виды поведения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  получены, в частности, при стимуляции мускариновых рецепторов в эпителиальных клетках почек человека НЕК-293 [2-4]. Показана первичная роль мобилизации запасенного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_s$ ) и поддержание колебаний запас-регулируемым входом  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCE) [3]. Для детального понимания механизмов формирования таких сигналов большую важность имеет мониторинг  $[\text{Ca}^{2+}]_s$  в нативных клетках. С применением генетически-кодируемых кальциевых сенсоров GEM-GECO1 и R-SERIA1er с цитозольной и ретикулярной локализацией ранее была проведена одновременная регистрация  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  и  $[\text{Ca}^{2+}]_s$  в клетках НЕК-293. Были продемонстрированы согласованные изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  и  $[\text{Ca}^{2+}]_s$  при серии кратковременных аппликаций ацетилхолина (ACh) [5]. В той же работе поведение данных концентраций было воспроизведено в математической модели, учитывающей кальций-индуцируемое высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{IP}_3$ -рецептор. Отмечено, что при повторяющихся стимулах имеется период рефрактерности ответов, в течение которого происходит восстановление  $[\text{Ca}^{2+}]_s$  до уровня, очень близкого к начальному уровню покоя [5]. Включение в модель SOCE ускорило восстановление  $[\text{Ca}^{2+}]_s$  и сокращало период рефрактерности, улучшая тем самым согласие с данными [6]. Ряд фактов предполагает регуляторную роль люминального  $\text{Ca}^{2+}$  в рефрактерности сердечных клеток, нарушения которой вызывают аритмию [7]. Поскольку для невозбудимых клеток аналогичные данные в литературе отсутствуют, в настоящей работе изучалось, в какой мере уровень депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  определяет амплитуду повторного ответа клеток НЕК-293 на действие ACh. Показана тесная корреляция между этими показателями,

указывающая на градуальную зависимость ответа  $[Ca^{2+}]_i$  от  $[Ca^{2+}]_o$  в процессе восстановления запаса. Вход  $Ca^{2+}$  в клетку предотвращает глубокое истощение запаса с утратой чувствительности к стимулу и обеспечивает восстановление  $[Ca^{2+}]_i$  за примерно инвариантное время.

**Методы.** В работе использовались клетки линии НЕК-293 с постоянной экспрессией белка-сенсора R-CEPIA1er. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Экстраклеточный (физиологический) раствор содержал (мМ): NaCl – 130, KCl – 5.5,  $CaCl_2$  – 2,  $MgCl_2$  – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Для получения среды с низким  $Ca^{2+}$ , 2 мМ  $Ca^{2+}$  во внеклеточной среде заменялись на 1 мМ EGTA + 0.6 мМ  $Ca^{2+}$  (102 нМ свободного  $Ca^{2+}$ ). Клетки были окрашены с использованием Fura-2 AM. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200, оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой iXon888 (Andor Technology) и фильтром Chroma 59022. Флуоресценцию клеток поочередно возбуждали на длинах волн  $340 \pm 5.5$  нМ,  $380 \pm 5.5$  нМ и  $572 \pm 17.5$  нМ, эмиссию регистрировали в областях  $505 \pm 35$  нМ и  $634 \pm 34$  нМ для Fura-2 и R-CEPIA1er, соответственно. Изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме оценивали по относительному изменению интенсивностей флуоресценции  $F_{340}/F_{380}$  для Fura-2 AM и  $\Delta F/F_0$  для R-CEPIA1er, где  $F_{340}$  и  $F_{380}$  – интенсивности эмиссии, возбуждаемой при 340 и 380 нМ,  $\Delta F = F - F_0$ ,  $F$  и  $F_0$  – текущая интенсивность эмиссии индикатора и интенсивность в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements. Число анализировавшихся клеток ( $N$ ) указано ниже для каждого эксперимента. Обработка данных производилась в программе SigmaPlot 14.5 (SYSTAT Software).

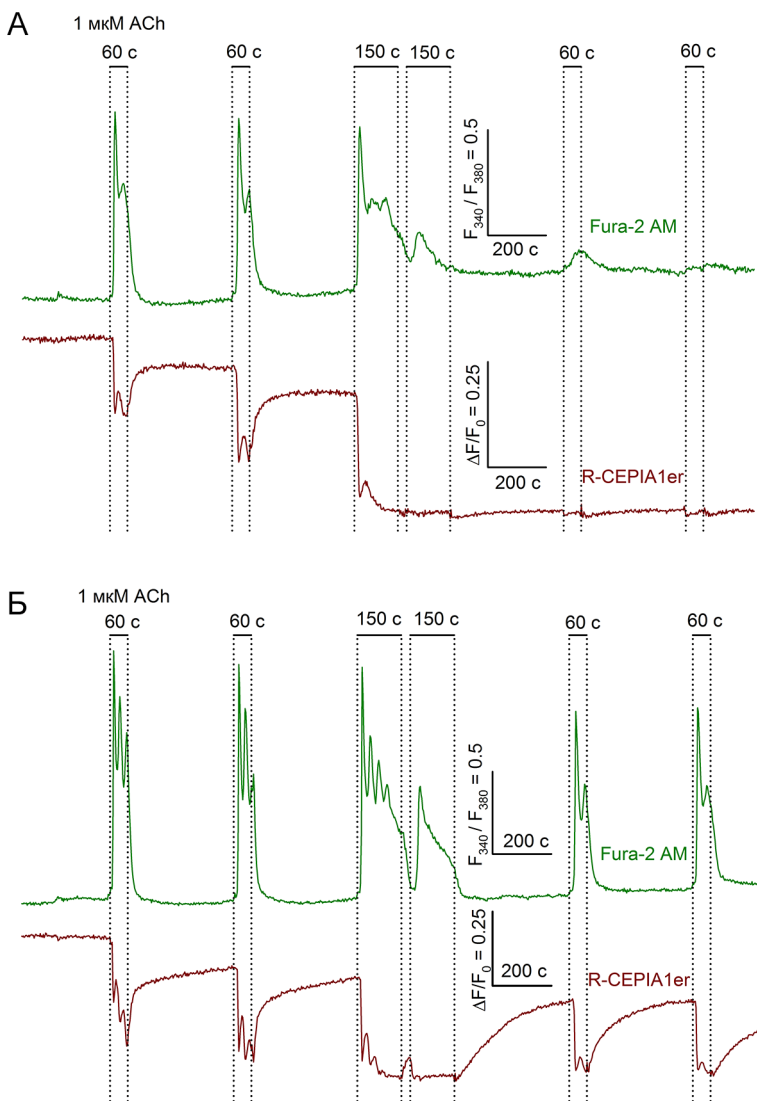
**Результаты и обсуждение.** Установлено, что кратковременная аппликация ACh инициирует импульсные  $Ca^{2+}$  сигналы в цитозоле клеток с задержкой, которая составляла порядка 30 с при умеренной дозе агониста ACh (1 мкМ) (рис. 1). При относительно длительной стимуляции (150 с) в значительном числе случаев (~16% клеток) обнаруживаются наложенные колебания небольшой амплитуды, которые постепенно опускаются и затухают (рис. 1 и рис. 2). Наблюдались также более глубокие колебания с меньшей частотой, имеющие 2-3 повышения  $[Ca^{2+}]_i$ , включая первый пик (16.4%). Преобладал одиночный пик с монотонным спадом без существенных колебаний (67.2%), где могла существовать более медленная вторая фаза (27.9%). Подобные типы поведения за аналогичный промежуток времени отмечались ранее для ответов НЕК-293 на карбахол [4]. Прекращение стимуляции приводило к ускоренному

спаду  $[Ca^{2+}]_c$ , который обычно наступал сразу же после удаления агониста, но иногда мог генерироваться еще один небольшой пик. Соответствующие изменения  $[Ca^{2+}]_c$  на рис. 1 (внизу) характеризуются быстрым спадом, затухающими колебаниями в ходе более медленного приближения к окончательному минимуму и двухфазным восстановлением запаса после стимуляции. Достигнутый при этом минимум не означает полное истощение измеряемого запаса, поскольку добавление тапсигаргина (TG), ингибитора ретикулярной АТР-азы, вызывало дополнительное снижение  $[Ca^{2+}]_c$ . Следует отметить, что установившийся уровень  $[Ca^{2+}]_c$  между стимуляциями, а также при 100 нМ экстраклеточном  $Ca^{2+}$  после TG-индуцированного опустошения запаса сохранялся постоянным, несмотря на изменения  $[Ca^{2+}]_c$  в широких пределах. Это свойство можно рассматривать как стабилизацию уровня  $[Ca^{2+}]_c$  относительно изменения его притоков в цитозоль из внеклеточной среды и из  $Ca^{2+}$ -запасающих органелл.



**Рис. 1.** Изменение флуоресценции Fura-2 (вверху) и сенсора R-CEPIA1er (внизу) в ответ на три аппликации 1 мкМ АСh, последующее снижение  $Ca^{2+}$  среды до 100 нМ и добавление 1 мкМ TG.  $N = 68$ .

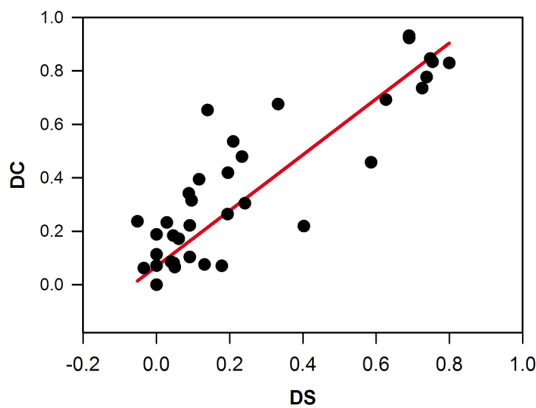
Как видно из рис. 1, после 60-с стимула пауза 6 мин приводит к восстановлению запаса, достаточного для генерации последующего ответа  $[Ca^{2+}]_c$  с полной амплитудой, также обладающего наложенными колебаниями. Сокращение паузы до 30 с приводило к частичному росту  $[Ca^{2+}]_c$  за время этой паузы и к небольшому снижению повторного ответа (не показано). Более глубокое и продолжительное опустошение запаса происходило при действии стимулов увеличенной длительности (рис. 2). Видно, что через 30 с короткой паузы второй стимул дает существенно ослабленный ответ  $[Ca^{2+}]_c$ , а последующая стимуляция через 6.5 мин может иметь различный эффект в зависимости от степени восполнения запаса в течение этой длительной паузы.



**Рис. 2.** Ответы двух репрезентативных клеток одного эксперимента на две аппликации 1 мкМ АСh увеличенной длительности (по 150 с) с различными эффектами последующей стимуляции. А – без восстановления  $[Ca^{2+}]_i$  в паузе 390 с, Б – значительное восстановление  $[Ca^{2+}]_i$ .  $N = 72$ .



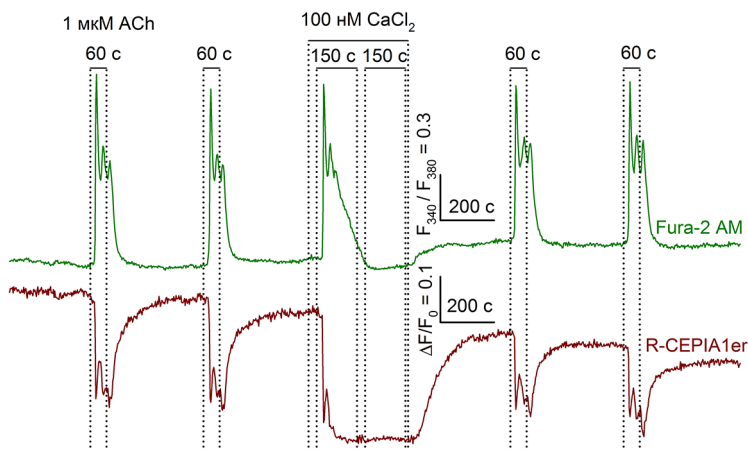
Для определения количественной связи между заполненностью запаса и амплитудой ответа  $[Ca^{2+}]_s$  мы использовали нормированные показатели для различных клеток. В результате была получена линейная регрессия с коэффициентом корреляции Пирсона  $r = 0.6941$  для короткой паузы и  $r = 0.902$  для длительной паузы (рис. 3), которые означают, соответственно, заметную и очень сильную связь. Эта корреляция свидетельствует о том, что имеется градуальная зависимость ответа  $[Ca^{2+}]_s$  от  $[Ca^{2+}]_s$  на момент начала стимуляции.



**Рис. 3.** Корреляция ( $r = 0.902$ ) между амплитудой ответа на тестовый стимул и степенью заполненности запаса  $Ca^{2+}$  после предыдущей стимуляции. Точки представляют различные клетки эксперимента рис. 2, тестовым является стимул № 5. По горизонтали  $DS = (F5 - F4min) / (F3 - F4min)$ , где  $F3$  – уровень  $[Ca^{2+}]_s$  к началу стимула № 3,  $F4min$  – его минимум при стимуле № 4,  $F5$  – значение  $[Ca^{2+}]_s$  к началу стимула № 5. По вертикали  $DC = A5/A3$ , где  $A3$  и  $A5$  – амплитуды сигнала  $[Ca^{2+}]_s$  для стимулов № 3 и № 5.

Для ответов  $[Ca^{2+}]_s$  в различных клетках характерен принцип «все-или-ничего», когда агонист при подпороговой дозе не стимулирует изменения цитозольного  $Ca^{2+}$ , но при более высоких концентрациях вызывает  $Ca^{2+}$  сигналы с близкой амплитудой [5,8]. Модель, основанная на общепринятых представлениях о кинетике  $IP_3$ -рецептора и  $Ca^{2+}$ -АТФ-аз, описывает такой порог и фактическое постоянство амплитуды  $[Ca^{2+}]_s$  ответа [5]. При этом в модели порог также существовал в процессе восстановления  $[Ca^{2+}]_s$ , где стимул вызывал либо незначительный, либо полноамплитудный  $Ca^{2+}$ -ответ [6], что отличается от поведения  $[Ca^{2+}]_s$  в эксперименте. Отсутствие в модели градуальной связи между  $[Ca^{2+}]_s$  и  $[Ca^{2+}]_s$  является указанием на то, что в реальной системе существуют медленные регуляторные факторы, не учтенные в модели, которые инициируются стимуляцией и приводят к устранению последующего резкого порога для стимул-зависимого ответа  $[Ca^{2+}]_s$ .

Чтобы оценить вклад источников цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в поддержание сигнала  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и восстановление системы после стимуляции, мы добавляли АСh в среде с низким  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 4) по протоколу, аналогичному протоколу на рис. 2. Как и показано ранее для НЕК-293, отсутствие входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку не снижает пик ответа [2,3,5], причем некоторое время могут сохраняться наложенные колебания. Но, в отличие от ответов в нормальной среде (рис. 2), далее уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  становится близким к базальному (рис. 4, первый удлинённый стимул), что свидетельствует о поддерживающем вкладе входа  $\text{Ca}^{2+}$  примерно через 60 с. При этом в некоторых клетках уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  после снижения мог немного повышаться, что можно интерпретировать как участие дополнительного  $\text{Ca}^{2+}$ -запаса в согласии с имеющимися данными [9]. При последующем стимуле уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в подавляющем числе клеток не только не повышался за счет мобилизации из внутренних источников, но и мог немного снижаться. Это явление может объясняться сильным истощением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Далее замена среды с низким  $\text{Ca}^{2+}$  на нормальную приводила к восстановлению базального или немного повышенного уровня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , в части клеток – после овершута (на рис. 4 он мал). Восстановление  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  происходило столь же быстро, как и без предынкубации в среде с 100 нМ  $\text{Ca}^{2+}$ , по-видимому, благодаря низкому  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и мощному SOCE, скорость которого резко растет [10] при уменьшении  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . После этого восстановления запаса клетка отвечала на АСh подобно начальному контролю.



**Рис. 4.** Эффект устранения входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку (два стимула по 150 с в среде с 100 нМ  $\text{Ca}^{2+}$ ) и последующее восстановление ответа в нормальной среде.  $N = 89$ .

В целом, результаты показывают, что степень опустошения запаса контролирует амплитуду и характер ответа  $[Ca^{2+}]_i$  на стимул, включая полное отсутствие ответа при низком уровне  $[Ca^{2+}]_i$ . Восстановление запаса после стимуляции требует нескольких минут, причем оно может происходить за то же время из состояния с глубоким истощением депонированного  $Ca^{2+}$ . Вход  $Ca^{2+}$  в клетку вносит вклад после пика ответа  $[Ca^{2+}]_i$  и является важным фактором преодоления рефрактерности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Berridge M.J.* // *Physiol. Rev.* 2016. 96: 1261-96.
2. *Luo D., Broad L.M., Bird G.S. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2001. 276: 5613-21.
3. *Bird G.S., Putney J.W. Jr.* // *J. Physiol.* 2005. 562: 697-706.
4. *Jing X., Chen L., Ren S., Luo D.* // *Cytotechnology.* 2011. 63: 81-8.
5. *Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2021. 1: 100012.
6. *Каймачников Н.П.* // Сб. «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 24-28 мая 2021.
7. *Györke S., Belevych A.E., Liu B et al.* // *J. Gen. Physiol.* 2017. 149: 877-88.
8. *Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. 1843: 1899-908.
9. *Konieczny V., Tovey S.C., Mataragka S. et al.* // *Cell Rep.* 2017. 18: 711-22.
10. *Luik R.M., Wang B., Prakriya M. et al.* // *Nature.* 2008. 454: 538-42.

## МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

*Коробкина Ю.Д.<sup>1</sup>, Пантелеев М.А.<sup>1,2</sup>, Свешникова А.Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. Д. Рогачева,  
Москва, Россия

**Введение.** Кальциевая сигнализация – один из ключевых способов трансдукции сигнала в клетках. Устройство кальциевой сигнализации в клетках невозбудимых тканей многих организмов сходно, поэтому сравнение механизмов кальциевой сигнализации между одними и теми же видами клеток разных организмов может помочь определить особенности устройства данной системы. В сперматозоидах мыши и человека кальциевый ответ может быть индуцирован стероидным гормоном прогестероном [1]. При этом в человеческих сперматозоидах прогестерон опосредованно активирует расположенный в жгутике сперматозоида кальциевый канал CatSper [2], который в покое ингибирован липидом

мембраны 2-арахидоноилглицеролом (2-АГ). Прогестерон активирует локализованную в жгутике гидролазу ABHD2, катализирующую расщепление 2-АГ на арахидоновую кислоту и глицерин. Расщепление 2-АГ приводит к активации CatSper и поступлению кальция в клетку [3]. Повышение концентрации кальция способно активировать фермент фосфолипазу C $\delta$  [4] (PLC $\delta$ 4). PLC $\delta$ 4 катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата (ИЗФ) из фосфолипидов мембраны. ИЗФ активирует ИЗФр, расположенные на кальциевом депо сперматозоида (RNE), и, таким образом, индуцирует высвобождение кальция в цитоплазму клетки через эти канал-рецепторы [5].

В мышинных сперматозоидах CatSper не ингибирован 2-АГ и нечувствителен к прогестерону [6], а ABHD2 расположена в мембране акросомы, а не в жгутике [6]. Также известно, что кальциевым депо в сперматозоиде мыши является акросома, а не RNE [7]. Точный механизм прогестероновой активации сперматозоидов мыши неизвестен.

Целью данной работы является уточнение молекулярных механизмов кальциевой сигнализации при физиологической активации в сперматозоидах человека и мыши.

**Материалы и методы.** *Материалы.* Fura-2AM (Molecular Probes, Eugene, OR); Fura-RED-AM (Molecular Probes, Eugene, OR); прогестерон, DMSO, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, BCA, глюкоза (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), аспирин (Bayer).

**Построение математической модели.** На основе литературных данных о кальциевой сигнализации в сперматозоидах млекопитающих нами построен ряд вычислительных моделей прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека и мыши: точечная модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека, точечная модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши, трехмерные модели для человека и мыши. Точечная компьютерная модель представляет собой систему дифференциальных уравнений, интегрируемых с помощью программного пакета COPASI (<https://copasi.org/>) [8]. Трехмерная компьютерная модель представляет собой систему дифференциальных уравнений в частных производных, интегрируемых с помощью программного пакета VCell (<https://vcell.org/>) [9].

**Экспериментальное наблюдение кальциевой активации в сперматозоидах.** Экспериментальное наблюдение прогестероновой активации окрашенных флуоресцентной меткой на кальций Fura 2 мышинных сперматозоидов производилось с помощью спектрофлуориметра. Активация клеток проводилась с помощью прогестерона в концентрации 50 мкМ. В части экспериментов перед добавлением прогестерона сперматозоиды инкубировались с аспирином в концентрации 100 нг/мл в течение пяти минут.

Наблюдение активации сперматозоидов человека, окрашенных флуоресцентными метками Fura Red или Fura-2, производилось в режиме эпифлуоресценции на микроскопе Nikon TI Eclipse с использованием проточных камер [10]. Активация клеток проводилась с помощью прогестерона в концентрации 5 мкМ.

**Результаты и выводы.** В ходе экспериментов было показано, что мышинные сперматозоиды активируются прогестероном в концентрации 50 мкМ с характерным временем активации и ответа 100 секунд, а сперматозоиды человека – в концентрации 5 мкМ с характерным временем активации и ответа 90 секунд или кальциевыми осцилляциями с периодом порядка сотен секунд.

Также произведены эксперименты с добавлением аспирина к сперматозоидам мыши. Показано, что кальциевый ответ на прогестерон отсутствует в сперматозоидах мыши при преинкубации с 2 мМ аспирина. Это подтверждает, что в сигнальном каскаде, скорее всего, участвует некоторая циклооксигеназа.

На основе литературных данных и проведенных экспериментов нами была построена схема реакций кальциевой активации в мышинных сперматозоидах. Предположительно, при активации прогестероном AVHD2 расщепляет 2-АГ до арахидоновой кислоты и глицерина [2]. Арахидоновая кислота трансформируется присутствующей в сперматозоидах мыши неутонченной циклооксигеназой в некоторый простагландин, активирующий G-белки. Далее происходит активация фосфолипазы C [4], катализирующей производство ИФ3, активирующего И3Фр, расположенные в мембране внутриклеточного хранилища кальция в сперматозоиде мыши (акросомы).

Также нами была построен ряд математических моделей кальциевой активации сперматозоидов человека и мыши: точечная модель для человека, точечная модель для мыши, трехмерная модель для человека и мыши.

Точечная модель прогестерон-индуцированной кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека была способна качественно описать как осцилляторный ответ, так и одиночный пик. Однако, в случае сперматозоидов человека, максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с, а максимальный период осцилляций – 50 с.

В случае сперматозоидов мыши модель качественно способна описать одиночный пик, а также кальциевые осцилляции с периодом порядка сотен секунд, наблюдаемые в других работах [11]. Как и в случае сперматозоидов человека, в случае сперматозоидов мыши максимальная ширина пика, описываемая одномерной моделью, составляет 40 с, максимальный период осцилляций – 50 с.

Трехмерная модель и для сперматозоидов человека, и для сперматозоидов мыши была способна количественно описать ширину пика в  $\sim 100$  сек и частоту осцилляций (100-300 сек) при коэффициенте диффузии кальция, меньшем, чем  $20 \text{ мкм}^2/\text{с}$ . Также трехмерная модель кальциевой активации в сперматозоидах человека была способна качественно описать описанную в литературе зависимость частоты кальциевых осцилляций от температуры и кальциевый ответ в сперматозоидах человека, помещенных в среду без кальция [12], а также низкочастотные кальциевые осцилляции в сперматозоидах мыши [11].

Также чтобы исследовать влияние перехода кальция между основной частью и головкой, была построена вспомогательная квазиточечная модель кальциевой сигнализации в сперматозоидах мыши, в которой цитозоль был разделен на два отсека. Эта модель могла описывать экспериментально наблюдаемые низкочастотные колебания, а период этих колебаний зависел от коэффициента скорости перехода кальция между двумя отсеками модели.

При помощи трехмерной модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах человека нами было проведено теоретическое исследование характера зависимости кальциевого ответа от коэффициента диффузии кальция. Было показано, что система может переключать свой тип ответа при изменении коэффициента диффузии кальция. В сперматозоидах человека при фиксированном коэффициенте диффузии ИЗФ, равном  $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$ , колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее  $70 \text{ мкм}^2/\text{с}$ . В сперматозоидах мыши при фиксированном коэффициенте диффузии ИЗФ, равном  $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$ , колебания в системе появлялись при коэффициенте диффузии кальция менее  $30 \text{ мкм}^2/\text{с}$ .

Также мы исследовали влияние пространственного распределения компонентов системы на тип ответа. Мы показали, что в сперматозоидах мыши период кальциевых осцилляций почти линейно зависел от скорости экструзии кальция из клетки кальциевой АТФазой плазматической мембраны РМСА. РМСА в сперматозоидах локализована в жгутике. При этом в модели для мыши, где РМСА была равномерно распределена, период кальциевых колебаний сократился до 70 с. Аналогичные результаты были получены для сперматозоидов человека.

В данной работе показано, что сигнальные пути, которые приводят к выработке ИЗФ в сперматозоидах человека и мыши при активации прогестероном, различны. Активность фосфолипазы С в сперматозоидах человека регулируется концентрацией ионов кальция. Она повышается при открытии кальциевого канала CatSper, который в покое ингибирован 2-АГ. Прогестерон активирует АВНД2, которая катализирует расщепление 2-АГ и опосредованно активирует CatSper.

В сперматозоидах мыши CatSper не ингибирован 2-АГ. При этом АВНД2 также активируется прогестероном и катализирует производство арахидоновой кислоты, которая конвертируется циклооксигеназой в

неуточненный простаноид, который активирует G-белковую сигнализацию, что приводит к активации фосфолипазы C.

При этом в обоих типах клеток некоторая временная задержка движения кальция от головы к хвосту является важным механизмом, регулирующим кальциевый ответ. Это указывает на то, что важную роль в генерации кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мышцы важную роль играет пространственная удалённость кальциевого депо и кальциевой АТФазы РМСА.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-74-00057.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Baldi E., Casano R., Falsetti C. et al. // J. Androl. 12(5): 323-30.
2. Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. // Nature. 2011. 471(7338): 387-91.
3. Miller M.R., Mannowetz N., Iavarone A.T. et al. // Science (80-). 2016. 352(6285): 555-59.
4. Fukami K., Yoshida M., Inoue T. et al. // J. Cell Biol. 2003. 161(1): 79-88.
5. Li L.-F., Xiang C., Zhu Y.-B., Qin K.-R. // J. Theor. Biol. 2014. 351: 58-66.
6. Strinker T., Goodwin N., Brenker C. et al. // Nature. 2011. 471(7338): 382-6.
7. Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.-W. et al. // J. Cell Physiol. 2005. 202(3): 663-71.
8. Hoops S., Sahle S., Gauges R. et al. // Bioinformatics. 2006. 22(24): 3067-74.
9. Moraru I.I., Morgan F., Li Y. et al. // IET Syst. Biol. 2008. 2(5): 352-62.
10. Balabin F.A., Morozova D.S., Mayorov A.S. et al. // Moscow Univ. Phys. Bull. 2018. 73(5): 526-33.
11. Romarowski A., Sánchez-Cárdenas C., Ramírez-Gómez H.V. et al. // Biol. Reprod. 2016. 94(3).
12. Kirkman-Brown J.C., Barratt C.L.R., Publicover S.J. // Biochem. J. 2004. 378(Pt3): 827-32.

## ФЛУКТУАЦИИ $[Ca^{2+}]_i$ , МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА И NADH В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ КОРТЕКСА МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ GCaMP6f

Лисина О.Ю.<sup>1</sup>, Згодова А.Е.<sup>2</sup>, Бакаева З.В.<sup>3</sup>, Шарипов Р.Р.<sup>1</sup>, Сурин А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет),  
Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГАУ «НМИЦ Здоровья Детей» Минздрава России, Москва, Россия

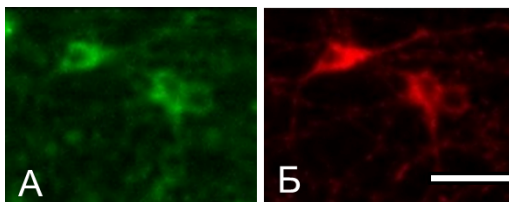
**Введение.** Изменения внутриклеточной концентрации свободного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в соме нейронов сопряжены с изменениями митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) и содержания NADH в митохондриях. Изменения  $[Ca^{2+}]_i$ , измеренные с помощью синтетических

$\text{Ca}^{2+}$  индикаторов семейства Fura, представляют собой усредненные значения концентраций в цитозоле, внутриклеточных органеллах и нуклеоплазме. В данной работе для выяснения зависимости  $\Delta\Psi_m$  и уровня NADH в митохондриях от изменений концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле сомы нейронов ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) использовали флуоресцентный белковый  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор GCaMP6f [1].

**Методы.** *Первичные нейроглиальные культуры* получали из коры головного мозга мышей P0-P2 линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J по методике, описанной в [2].

**Флуоресцентно-микроскопические измерения** выполнены, как описано в [3]. Система анализа изображений состояла из микроскопа Olympus IX-71 (Япония), системы освещения Lambda 10-2 (Sutter Instruments Co, США), CCD-камеры CoolSNAP HQ2 (Photometrics, США) и программного обеспечения MetaFluor (Universal Imaging Corp., США). Нагрузку клеток  $\text{Ca}^{2+}$  индикаторами Fura-2 и Fura-FF и митохондриальным потенциал-чувствительным зондом TMRM проводили как описано в [3].

**Результаты.** В использованной линии трансгенных мышей  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор GCaMP6f не имеет адресной пептидной последовательности для доставки в какой-либо внутриклеточный компартмент и после синтеза на рибосомах должен оставаться в цитозоле. Анализ изображений подтверждает, что флуоресценция GCaMP6f сосредоточена в цитозоле и не обнаруживается в ядре (рис. 1А). Примерно такое же распределение в клетке демонстрирует митохондриальный зонд TMRM (рис. 1Б). Очевидно, размер молекулы GCaMP6f (MW около 51 кДа) [4] превышает размер ядерной поры и без адресной метки сенсор не может попасть в ядро, поэтому изменения сигнала GCaMP6f отражают изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Синтетические  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы Fura-2 или Fura-FF имеют малый размер (MW около 1 кДа), легко проникают в ядро и их сигналы отражают изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , усредненные по цито- и нуклеоплазме.



**Рис. 1.** Изображения первичной нейроглиальной культуры из кортекса трансгенных мышей, экспрессирующих флуоресцентный белковый  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор GCaMP6f и окрашенных потенциал-чувствительным митохондриальным зондом TMRM. Флуоресценция GCaMP6f (А, зеленое изображение): Ex 485 нм/Em 525 нм; флуоресценция TMRM (Б, красное изображение): Ex 565 нм/Em  $\geq 610$  нм). Возраст культуры 17 DIV. Масштабная полоска соответствует 20 мкм. Объективы  $20\times/\text{NA} = 0.75$



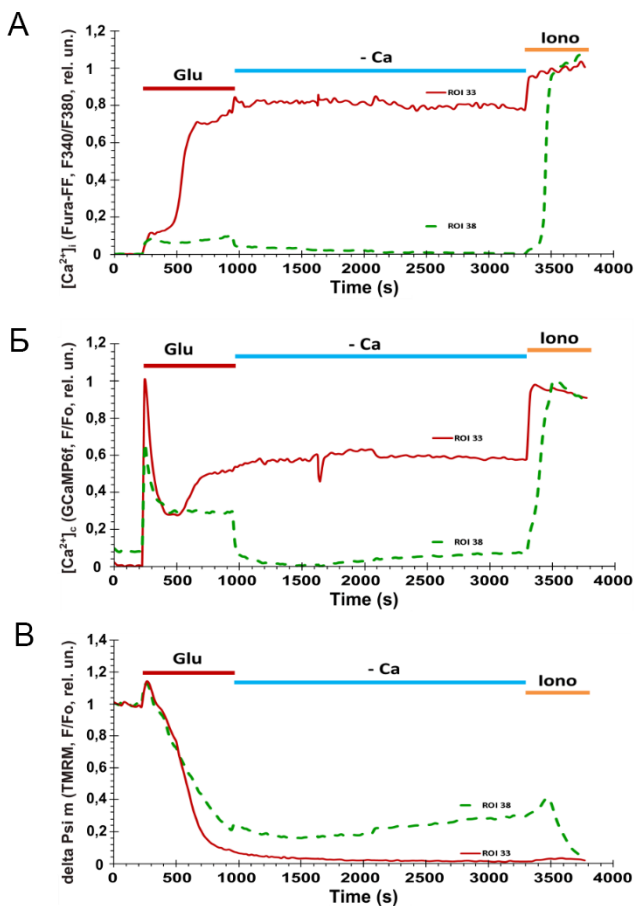
Основная часть клеток, экспрессировавших GCaMP6f, имела в невозбужденном состоянии (перед добавлением глутамата, Glu) стабильно низкую концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ , регистрируемую как по флуоресценции GCaMP6f, так и с помощью индикаторов Fura-FF и Fura-2. Добавление в безмагниевого буфера глутамата (Glu, 10 мкМ, глицин 10 мкМ) вызывало транзиторный скачок сигнала обоих типов индикаторов  $\text{Ca}^{2+}$ , вслед за которым следовал вторичный подъем  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (отсроченная кальциевая дисрегуляция, ОКД), четко регистрируемый с помощью Fura-FF (рис. 2А) и Fura-2 (не показано). Сигналы GCaMP6f показали только начало вторичного подъема  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ , амплитуда которого в большинстве клеток не превышала первоначальный скачок  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  (рис. 2Б).

Митохондриальный потенциал начинает резко падать в тот момент, когда в нейронах развивается ОКД. В данном эксперименте это отчетливо видно из сопоставления графиков на рис. 2В и хорошо согласуется с опубликованными ранее данными [5].

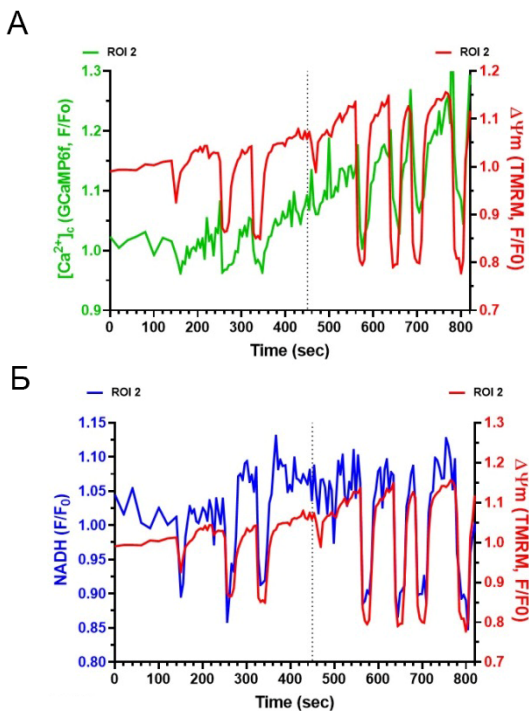
Изменения сигналов Fura-FF и TMRM в клетках, не экспрессировавших GCaMP6f, имели такой же характер, как и представленные на рис. 2 (данные не показаны).

Особенностью культуры клеток из коры головного мозга трансгенных мышей оказалась способность нейронов к спонтанным изменениям  $\Delta\Psi_m$ , синхронным с флуктуациями  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ . Пример таких синхронных изменений показан на рис. 3А. Доля таких клеток составляла около 10%. Эти изменения относятся именно к цитозолу, поскольку GCaMP6f не имеет адресной пептидной последовательности и не может попадать во внутриклеточные органеллы. В покоящихся нейронах GCaMP6f не присутствует в ядре либо обнаруживается в небольших количествах (рис. 1). Вероятно, GCaMP6f не может пассивно диффундировать в ядро, потому что этого не позволяют размеры ядерных пор, или сенсор эффективно удаляется из ядра.

Сопоставление сигналов зонда TMRM и кальциевого сенсора GCaMP6f показало, что быстрые транзиторные флуктуации флуоресценции TMRM совпадают с падениями концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле (рис. 3А). Учитывая высокую аффинность GCaMP6f по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d$  в диапазоне 100-300 нМ; [4]), а также то, что в покоящихся нейронах  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  не превышает 100 нМ [6], транзиторные изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  составляют не более нескольких десятков наномолей/литр. Очевидно, этого количества  $\text{Ca}^{2+}$  достаточно для активации дыхательной цепи, но недостаточно для сильной деполаризации внутренней митохондриальной мембраны. Второй вариант реализуется при поступлении большого количества  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс митохондрий, которое происходит при нейротоксическом действии Glu (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменения средней по клетке внутриклеточной концентрации свободного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_c$ ) и трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) в нейронах первичной нейроглиальной культуры из кортекса мыши. Возраст культуры 13 DIV. Приведены графики для 2 представителей нейронов, экспрессировавших GCaMP6f, в одном из которых (ROI 33) за время действия 10 мкМ Glu развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД), а во втором ОКД не состоялась (ROI 38). Измерения  $[Ca^{2+}]_i$  выполнены с помощью (А) синтетического флуоресцентного индикатора Fura-FF (Ex 340 и 380 нм/Em 525 нм) и (Б) эндогенного  $Ca^{2+}$ -сенсора GCaMP6f (Ex 485 нм/Em 525 нм); (В) измерения  $\Delta\Psi_m$  выполнены с использованием флуоресцентного зонда TMRM (Ex 565 нм/Em  $\geq 610$  нм). Изменения  $\Delta\Psi_m$  нормированы относительно исходных значений в покое нейронах.



**Рис. 3.** Изменения трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ), концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_c$ ) и уровня эндогенного NADH в первичной нейроглиальной культуре из кортекса трансгенной мыши. Изменения  $[Ca^{2+}]_c$  (А, зеленая кривая, левая шкала ординат) регистрировали, как сказано в подписи к рис. 2. Изменения  $\Delta\Psi_m$  регистрировали с помощью TMRM (правые шкалы ординат), как описано на рис. 2. Снижение флуоресценции TMRM в данном протоколе соответствует увеличению  $\Delta\Psi_m$ . Изменения уровня NADH (Б, синяя кривая, левая шкала ординат) измеряли по интенсивности эндогенной флуоресценции (Ex 360 нм/Em 450 нм). Концентрацию TMRM (20 нМ) во всех буферных растворах подбирали таким образом, чтобы при увеличении  $\Delta\Psi_m$  и захвате зонда митохондриями происходило концентрационно-зависимое самогашение флуоресценции TMRM в матрице митохондрий [5].

Для увеличения  $\Delta\Psi_m$  требуется ускорение работы ферментов дыхательной цепи и, соответственно, усиленное потребление их субстратов, в первую очередь NADH, субстрата комплекса I [7]. Поэтому одновременно с измерениями  $[Ca^{2+}]_c$  и  $\Delta\Psi_m$  были выполнены измерения уровня внутриклеточного NADH, около 70% которого заключено в митохондриях [8]. Сопоставление сигналов зонда TMRM с изменениями эндогенной флуоресценции, обусловленной NADH, показало, что скачки

гиперполяризации совпадают с падениями флуоресценции NADH (рис. 3Б). Такие изменения NADH согласуются с представлениями о том, что для увеличения  $\Delta\Psi_m$  необходимо ускорение работы ферментов дыхательной цепи митохондрий и, соответственно, увеличение потребления NADH комплексом I.

**Выводы.** Применение высокоаффинного  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора GCaMP6f, локализованного в цитозоле нейронов, позволило обнаружить небольшие кратковременные падения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , синхронные со скачками роста  $\Delta\Psi_m$  и одновременными усилениями потребления NADH. Не исключено, что эти изменения отражают коммуникацию между митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом, которую труднее обнаружить при использовании синтетических  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов, заполняющих не только цитозоль, но и другие компартменты клеток.

Работа выполнена при поддержке средств Гос. задания № FGFU-2022-0012 и субсидии Минобрнауки России № 08-07-S6/2021/82930.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dana H., Chen T.W., Hu A., Shields B.C. et al. // PLoS ONE. 2014. 9(9): e108697.
2. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E. et al. // Front. Neurosci. 2019. 13: 1027.
3. Сурин А.М., Горбачева Л.П., Савинкова И.Г. и др. // Биохимия. 2014. 79(2): 196-208.
4. Akerboom J., Vézélez Rivera J.D., Rodríguez Guilbe M.M. et al. // J. Biol. Chem. 2009. 284(10): 6455-64.
5. Khodorov B. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004. 86: 279-351.
6. Kiedrowski L. // Mol. Pharmacol. 1999. 56: 619-32.
7. Denton R.M. // BBA - Bioenergetics. 2009. 1787: 1309-16.
8. Li D., Zheng W., Qu J.Y. // Optics Letters. 2008. 33(20): 2365-7.

## LD-ПЕПТИДАЗА БАКТЕРИОФАГА 3 *AEROMONAS* И КАЛЬЦИЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФАГОЛИЗИСА

Микулинская Г.В.<sup>1</sup>, Чернышов С.В.<sup>1</sup>, Мусаева А.А.<sup>1</sup>, Тарлачков С.В.<sup>1</sup>,  
Азев В.Н.<sup>1</sup>, Прохоров Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушкино, Россия

**Введение.** Бактериофаг лизирует клетку бактерии-хозяина изнутри на заключительной стадии своего жизненного цикла, обеспечивая выход в среду зрелого потомства. Разрушение клеточной стенки осуществляют

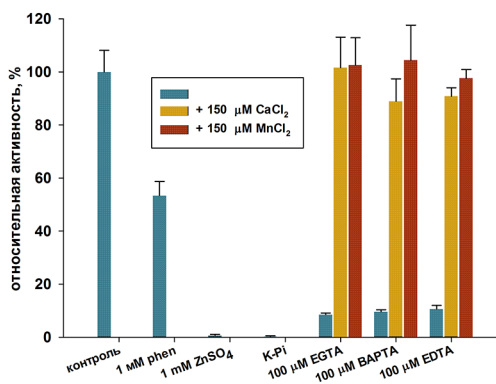
фагоспецифические белки: холин, образующий поры в цитоплазматической мембране, и фермент-эндолизин, деградирующий пептидогликан. Грамотрицательные бактерии имеют также наружную мембрану, для ее деструкции необходим третий тип белков – спанины [1]. Ранее считалось, что триггером разрушения клеточной стенки является образование холиновых пор, а сведения об уровнях регуляции фаголизиса были ограничены. Регуляторная роль в фаголизисе грамотрицательных бактерий ионов кальция, своеобразным «депо» которых является периплазма, впервые была предположена после обнаружения кальций-зависимого эндолизина – пептидазы бактериофага T5 Siphoviridae (EndoT5) [2]. Этот фермент относится к семейству цинксодержащих пептидаз M15\_C; ион цинка непосредственно участвует в нуклеофильном замещении при гидролизе. Сайт-направленный мутагенез вкпе с анализом структуры выявил у EndoT5 неканонический аналог EF-петли кальцийсвязывающих белков [3,4]. Иона кальция выступает в роли структурного регулятора: связывание  $Ca^{2+}$  фиксирует подвижную петлю на глобулярном домене, приводя активный центр с каталитическим цинком в «открытую» конформацию [5]. Активация фермента-пептидазы именно в периплазме, где находится его субстрат-пептидогликан, а не в цитоплазме, где белок синтезируется, имеет очевидный биологический смысл. Дополнительный уровень регуляции лизиса клетки-хозяина с помощью периплазматических ионов дает фагу эволюционные преимущества и позволяет предположить распространение такого пути среди фагов грамотрицательных бактерий. Однако до тех пор, пока EndoT5 остается единственным охарактеризованным  $Ca^{2+}$ -активируемым эндолизином, нет достаточных оснований считать единичный случай общебиологической закономерностью.

Целью настоящей работы было проанализировать распространенность EF-подобной петли у эндолизинов, выбрать среди обнаруженных последовательностей наиболее удаленный ортолог EndoT5 и охарактеризовать его биохимически и структурно, чтобы расширить представления о роли кальция в фаголизисе грамотрицательных бактерий.

**Результаты.** Поиск ортологичных белковых последовательностей вели среди фагов таксона Caudovirales, задав в качестве критериев вырожденную последовательность EF-подобной петли EndoT5 состава GxDW[D,N]xxGxxxDE и присутствие двух остатков гистидина и двух аспаргата, координирующих каталитический цинк у пептидаз подсемейства M15\_C. Было обнаружено 55 уникальных последовательностей, среди которых - гипотетический белок APU00465.1 длиной 135 аминокислот бактериофага 3 (Myoviridae), инфицирующего гетеротрофные грамотрицательные палочковидные бактерии рода *Aeromonas*. Этот удаленный ортолог EndoT5 (38% идентичности) был выбран для исследования. Ген, кодирующий последовательность

природного белка EndoA3, был синтезирован искусственно и клонирован в плазмиду pET28a. Растворимый белок продуцировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) путем индукции 0.05 мМ IPTG в течение 15 часов при 20°C. Электрофоретически гомогенный препарат EndoA3 получали, последовательно хроматографируя осветленный экстракт на Toyopearl DEAE 650M и фосфоцеллюлозе. Сайт-специфичность фермента определяли с помощью миметика пептидогликана N-ацетилглюкозаминил-(β1→4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамил-L-аланил-D-аланина [6]. Процесс гидролиза контролировали с помощью гомо- и гетероядерных корреляционных ЯМР спектров (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY; <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY; <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) исходного миметика и продуктов его расщепления EndoA3. Было зафиксировано превращение сигнала карбонильного углерода первого L-аланина в сигнал концевого карбоксила, сопровождающееся перекрытием сигналов β-протонов D-глутамата вследствие потери ими окружения. Таким образом, EndoA3 является L-аланил-D-глутаматпептидазой, как и EndoG5.

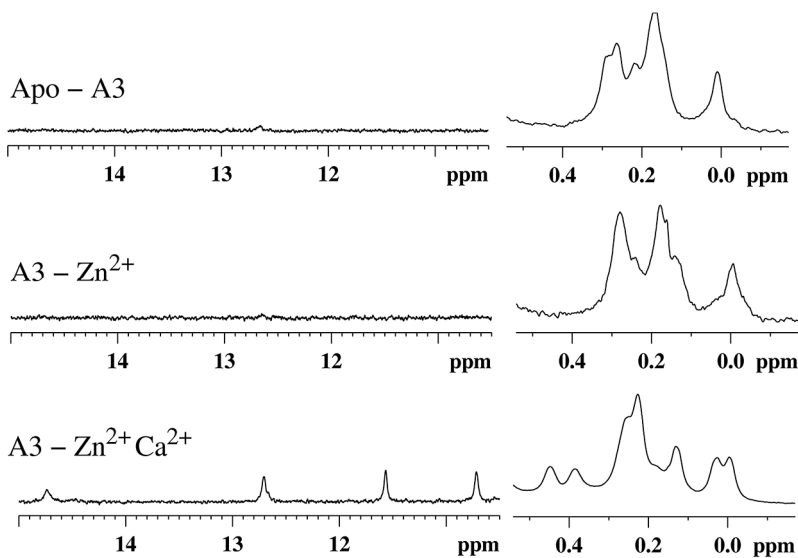
Максимальная удельная литическая активность чистого препарата EndoA3 составила 4482 ± 299 Е/мг. Оптимум рН лежит в области значений от 8.5 до 9.5. Молярный избыток ионов цинка эффективно ингибирует EndoA3 (это характерная черта цинк-зависимых пептидаз) (рис. 1). Потеря активности EndoA3 в калий-фосфатном буфере, вероятно, вызвана плохой растворимостью фосфатов ионов - каталитического Zn<sup>2+</sup> и регуляторного Ca<sup>2+</sup>. Интересно, что хелатор цинка фенантролин радикально на активность не влияет. Фермент термоллабилен – выдерживает нагревание до 50°C, теряет три четверти активности при повышении температуры до 60°C и полностью инактивируется при дальнейшем нагреве. Инактивация необратимая и сопровождается выпадением осадка.



**Рис. 1.** Влияние ингибиторов на активность EndoA3 и восстановление активности после ингибирования.

Предположение, что фермент является  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемым, подтвердилось экспериментально: как хелаторы широкого спектра действия (EGTA, EDTA), так и специфичный к кальцию хелатор ВАРТА являются ингибиторами EndoA3 (рис. 1); активность после ингибирования полностью восстанавливается добавлением ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$  (рис. 1).

Структурные особенности EndoA3 в растворе исследовали методом ЯМР спектроскопии трех препаратов: лишенной ионов апоформы, цинксодержащей формы и двухионной  $\text{Zn}^{2+}\text{Ca}^{2+}$ -формы (рис. 2). Наличие сигналов в высокопольной (0.5-0.0 ppm) части  $^1\text{H}$  ЯМР спектра апоформы фермента указывает на существование гидрофобного ядра, боковые цепи алифатических аминокислотных остатков которого фиксированы относительно радикалов ароматических остатков. Связывание  $\text{Zn}^{2+}$  сопровождается ростом дисперсии сигналов в этой части спектра, что свидетельствует об увеличении плотности упаковки кода EndoA3. Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  цинксодержащей формой EndoA3 приводит к дальнейшему увеличению дисперсии высокопольных резонансов, а также к возникновению низкопольных резонансов (10.72, 11.56, 12.71 и 14.74 ppm) от  $\delta$ - и  $\epsilon$ -NH-протонов имидазольных колец остатков гистидинов активного центра. Таким образом, оба иона необходимы для формирования структуры функциональной глобулы.



**Рис. 2.**  $^1\text{H}$  ЯМР спектры EndoA3, сверху вниз: безионная апоформа, цинковая форма, цинк-кальциевая форма. Слева низкопольная, справа высокопольная части спектров.

Исследование спектра бактериолитического действия нового эндолизина показало, что EndoA3 при применении извне эффективно лизирует пермеабелизованные хлороформом клетки грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*), а также живые клетки грамположительных бактерий рода *Bacillus*, пептидогликан которых относится к тому же типу A1γ [7], что и пептидогликан грамотрицательных микроорганизмов (к последним принадлежит и хозяин фага 3 *Aeromonas sp.*).

**Обсуждение.** Таким образом, белковая последовательность APU00465.1 бактериофага 3 *Aeromonas* представляет собой функциональный эндолизин, активируемый ионами кальция. Это второй доказанный пример литического фермента с подобной регуляцией. Тот факт, что исследованный эндолизин является наиболее далеким ортологом охарактеризованного ранее Ca<sup>2+</sup>-зависимого EndoT5, позволяет заключить, что все 55 обнаруженных фагоспецифических уникальных последовательностей также являются Ca<sup>2+</sup>-активируемыми литическими L,D-пептидазами. EF-подобные петли встречаются преимущественно у эндолизинов фагов, инфицирующих энтеробактерии родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Pectobacterium*; 6 последовательностей принадлежат фагам *Aeromonas*; 1 белок – фагу анаэробной бактерии рода *Shewanella*. Сходство EF-подобной петли с каноническими EF-мотивами очевидно конвергентное; трудно сказать определенно, возникла петля однократно у общего предка, распространившись затем с помощью горизонтального переноса генов, или это произошло независимо у нескольких (двух) таксономических групп фагов, передаваясь затем внутри этих групп. Следует подчеркнуть, что геномный поиск не ограничивали по типу таксонов бактерий-хозяев, однако неканонические EF-подобные Ca<sup>2+</sup>-связывающие петли обнаружены только у фагов, инфицирующих грамотрицательные бактерии. Очевидно, возникновение активации периплазматическим кальцием как дополнительного уровня регуляции фаголизиса – результат коэволюции бактериофагов и их грамотрицательных хозяев.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-24-00210.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Young R. // Curr. Opin. Microbiol. 2013. 16(6):790-7.
2. Mikoulinaka G.V., Odnokova I.V., Zimin A.A. et al. // FEBS J. 2009. 276(24): 7329-42.
3. Prokhorov D.A., Mikoulinaka G.V., Molochkov N.V. et al. // RSC Adv. 2015. 5: 41041-9.
4. Kovalenko A.O., Chernyshov S.V., Kutysenko V.P. et al. // Metallomics. 2019. 11(4): 799-809.



5. *Kutyshenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Prokhorov D.A. et al. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. 164: 2711-6.*

6. *Azev V., Chulin A., Molchanov M. et al. // PeerJ. 2021. 9: e11480.*

7. *Schleifer K.H., Kandler O. // Bacteriol Rev. 1972. 36(4): 407-77.*

## 2-АМИНОЭТОКСИДИФЕНИЛ-БОРАТ МОДУЛИРУЕТ ВХОД $\text{Ca}^{2+}$ В МАКРОФАГАХ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ

*Миленина Л.С.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Крутецкая Н.И.<sup>1</sup>,  
Бадюлина В.И.<sup>1</sup>, Симонян А.О.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский  
университет, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (глутоксим и моликсан) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [1-3]. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Приводит к более быстрому регрессу тяжести заболевания в более легкую форму [4].

Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания. Ранее [5,6] нами впервые было показано, что глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргинчувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крыс.

Депозависимый, или «емкостной» вход  $\text{Ca}^{2+}$  является универсальным механизмом регулируемого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, и участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, активация иммунных клеток, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии [7,8]. Основными компонентами, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , являются  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы *Orai1* в плазмалемме и  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор *STIM1* в мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -депо [9]. При опустошении  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, *STIM1* олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками *Orai1*, вызывая депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  [9,10].

После обнаружения важной роли депозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в патогенезе тяжелых заболеваний человека, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит (severe combined immunodeficiency, SCID), назальный полипоз, ревматоидный артрит, эктодермальная дисплазия, тромбоз, острый панкреатит, аутоиммунные и аллергические заболевания [11,12], возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов депозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

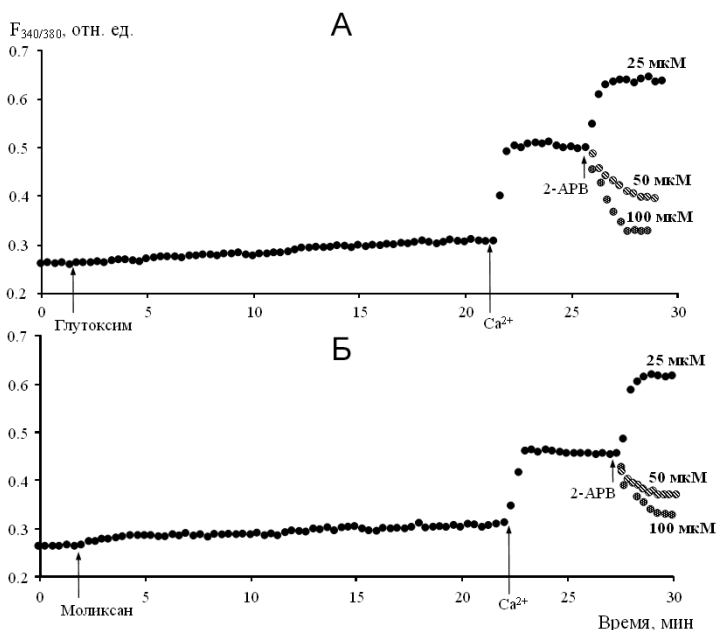
Из различных фармакологических модуляторов депозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов лучше других исследован 2-аминоэтоксидифенил-борат (2-APB). 2-APB широко использовался в качестве инструмента исследования механизмов функционирования депозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов [13,14]. Показано, что 2-APB модулирует депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках различных типов [13-15].

Учитывая важную роль депозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние 2-APB на депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемый иммуномодуляторами глутоксिमом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы.

**Методика.** Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22°C через 1-2 сут после начала культивирования клеток на автоматизированной установке для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нМ, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нМ. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [16]. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждую регистрацию получали для группы из 40--50 клеток. На рисунках представлены результаты однотипных экспериментов из 6-8 независимых. Достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ . Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нМ ( $F_{340}/F_{380}$ ) во времени, отражающего динамику изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках в зависимости от времени измерения [17].

**Результаты.** В контрольных экспериментах мы обнаружили, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1А)

или 100 мкг/мл моликсана (рис. 1Б) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. В среднем через 20 мин после добавления агентов  $[Ca^{2+}]_i$  увеличивалась от базального уровня, равного  $90 \pm 17$ , до  $171 \pm 20$  нМ ( $n = 6; p < 0.05$ ) для глутоксима и  $177 \pm 21$  нМ ( $n = 6; p < 0.05$ ) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$  наблюдалось дальнейшее повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее вход  $Ca^{2+}$  в цитозоль (рис. 1А, 1Б). В среднем увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  во время входа  $Ca^{2+}$  составило  $336 \pm 34$  и  $246 \pm 31$  нМ ( $n = 6; p < 0.05$ ) для глутоксима и моликсана соответственно.



**Рис. 1.** Влияние 2-аминоэтоксифенил-бората (2-АРВ) на депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , вызываемый глутоксимом или моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM  $F_{340}/F_{380}$  при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. К макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 100 мкг/мл глутоксима (А) или моликсана (Б), через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; на фоне развившегося входа  $Ca^{2+}$  добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксифенил-бората (2-АРВ).

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 2-АРВ на фоне развившегося депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемого глутоксимом, эффект 2-АРВ зависит от его концентрации. В концентрации 25 мкМ 2-АРВ вызывал значительную потенциацию входа  $\text{Ca}^{2+}$  (на  $87.4 \pm 19.2\%$ ,  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ). В то же время добавление 2-АРВ в концентрации 50 или 100 мкМ приводило к подавлению депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 1А). Подавление входа  $\text{Ca}^{2+}$  при действии 50 мкМ 2-АРВ составило  $52.5 \pm 12.4\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ), а в концентрации 100 мкМ –  $87.2 \pm 11.7\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ).

Сходные результаты мы получили при добавлении 2-АРВ на развившийся депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированный моликсаном (рис. 1Б). При воздействии 25 мкМ 2-АРВ наблюдалась потенциация входа  $\text{Ca}^{2+}$  на  $95.3 \pm 21.3\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ). При приложении 50 мкМ 2-АРВ происходило подавление входа  $\text{Ca}^{2+}$  на  $60.5 \pm 13.1\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ), а при воздействии 100 мкМ 2-АРВ – на  $90.2 \pm 7.3\%$  ( $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ).

**Обсуждение.** Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными в литературе. Так, было обнаружено, что 50 мкМ 2-АРВ практически полностью подавляет депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый тапсигаргином в макрофагах из костного мозга мыши [18] и амелобластах мыши (линия LS8) [19]. Дозозависимое модулирующее влияние 2-АРВ на депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  было показано также на клетках различных типов: клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК293) [20], Т-клетках линии Jurkat человека, В-клетках цыпленка (линия DT40) и лейкоцитарных базофилах крысы [21]. В низких концентрациях (<30 мкМ) 2-АРВ потенцирует, в то время как в более высоких концентрациях практически полностью подавляет депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ . Полагают, что в низких концентрациях 2-АРВ потенцирует депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  путем прямого расширения (dilating) поры открытых Orai1 каналов [22,23]. При этом диаметр поры Orai1 каналов увеличивается с 3.8 до 4.6 Å. Обнаружено также, что 2-АРВ конкурирует со STIM1 за активацию каналов Orai1 [24]. Ингибирование депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  при действии высоких концентраций 2-АРВ может быть связано с нарушением взаимодействия между белками STIM1 и Orai1 [20,25]. В дальнейшем было показано, что 2-АРВ может подавлять депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , быстро и прямо ингибируя оба молекулярных участника 'емкостного' входа  $\text{Ca}^{2+}$ , Orai1 каналы и белки STIM1 [26].

Таким образом, мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что 2-АРВ дозозависимо модулирует (активирует или ингибирует) депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемый иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном. Это комплексное действие 2-АРВ на депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  может быть связано с его влиянием на оба компонента мультибелкового комплекса депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , на белки STIM1 и Orai1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, как и для клеток других типов, 2-АРВ является удобным фармакологическим инструментом для изучения депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Кроме того, результаты дополнительно подтверждают, что вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый глутоксимом или моликсаном, происходит согласно модели депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ .

Работа выполнена в рамках Договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20 от 12.03.2020.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов А.Е., Кожемякин Л.А., Антушевич А.Е. и др. // Вест. Хирург. 2001. 4(2): 32-8.
2. Соколова Г.Б., Сеницын М.В., Кожемякин Л.А., Перельман М.И. // Антибиотики и химиотерапия. 2002. 47(2): 20-3.
3. Толстой О.А., Цыган В.Н., Климов А.Г. и др. // Известия Рос. Военно-мед. Акад. 2019. 38(1): 271-7.
4. Dubina M.V., Gomonova V.V., Taraskina A.E. et al. // BMC Infect Dis. 2021. 21(1): 536.
5. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. // Цитология. 2008. 50(5): 452-61.
6. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др. // Цитология. 2011. 53(9): 708.
7. Putney J.W. // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. 981: 205-14.
8. Putney J.W. // Neurochem. Res. 2011. 36: 1157-65.
9. Prakriya M., Lewis R.S. // Physiol. Rev. 2015. 95: 1383-36.
10. Lunz V., Romanin C., Frischauf I. // Cell Calcium. 2019. 77: 29-38.
11. Lacruz R.S., Feske St. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2015. 1356: 45-79.
12. Feske St. // Cell Calcium. 2019. 80: 112-6.
13. Putney J.W. // Mol. Interv. 2010. 10: 209-18.
14. Bird G.S., Putney J.W. // Calcium entry channels in non-excitabile cells. Kozak J.A., Putney J.W. (eds). CRC Press. 2018. 311-324.
15. Jairaman A., Prakriya M. // Channels. 2013. 7: 402-14.
16. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. // J. Biol. Chem. 1985. 260: 3440-50.
17. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. // J. Biol. Chem. 2002. 277: 16559-66.
18. Vaeth M., Zee I., Concepcion A.R. et al. // J. Immunol. 2001. 195: 1202-17.
19. Nurbaeva M.K., Eckstein M., Snead .ML. et al. // J. Dent. Res. 2015. 94: 1471-7.
20. De Haven W.L., Smyth J.T., Boyles R.R. et al. // J. Biol. Chem. 2008. 283: 19265-73.
21. Prakriya M., Lewis R.S. // J. Physiol. 2001. 536. 1: 3-19.
22. Xu X., Ali Sh., Li Y. et al. // Sci. Rep. 2016. 6: 29304.
23. Ali Sh, Xu T, Xu X. // J. Physiol. 2017. 595: 3085-95.
24. Yamashita M., Somasundaram A., Prakriya M. // J. Biol. Chem. 2011. 286: 9429-42.
25. Peinelt C., Lis A., Beck A. et al. // J. Physiol. 2008. 586: 3061-73.
26. Wei M., Zhou Y., Sun A. et al. // Pflugers Arch. 2016. 468: 2061-74.

## КИНЕТИКА ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА, ФЕНОТИПЫ КЛЕТОК

*Миндукшев И.В., Добрылко И.А., Фок Е.М., Волкова А.А., Гамбарян С.П.*

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Обеспечивая гемостаз, тромбоциты, в ответ на нарушение эндотелия, быстро трансформируются с изменением формы и функциональных свойств, по существу меняя свой фенотип. Гетерогенные субпопуляции тромбоцитов с активированными и/или рефрактерными фенотипами постоянно возникают в условиях повреждения эндотелия, воспалительных или онкологических процессов, зачастую активно влияя на эти патологии [1-4]. Несмотря на то, что качественно различимые фенотипы тромбоцитов все чаще связывают с различными патологическими состояниями; однако происхождение и значение фенотипических вариаций тромбоцитов остается неясным и концептуально неопределенным. Изменение фенотипа клеток связано с цепочкой внутриклеточных сигнальных реакций, вызванной активацией рецепторов тромбоцитов. Представление общесистемных профилей данных протеомики тромбоцитов в виде цепных сетей причинно связанных внутриклеточных событий или карт путей является молекулярной основой фенотипирования [5]. Гемостаз, сложная биологическая система, включающая сотни согласованных реакций, протекающих в плазме, на поверхности и внутри клеток. Можно выделить ключевые реакции, меняющие фенотип тромбоцитов: 1) адгезия тромбоцитов на коллагеновом слое, 2) начальная активация вызывающая изменение формы клеток – shape change, 3) выброс  $\delta$ - и  $\alpha$ -гранул, 4) активация на поверхности интегриновых рецепторов  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, 5) агрегация клеток посредством фибриногеновой связи через рецепторы  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, 6) образование прокоагулянтных клеток (участие в генерации тромбина), 7) образование микровезикул тромбоцитов, 8) коагуляция с участием тромбоцитов: образование тромба, скрепленного фибриновой нитью [6]. Некоторые из этих реакций являются обратимыми (деагрегация) и необходимы для локализации процесса тромбообразования.

Цель работы: разработка экспериментальной модели клеточного гемостаза, исследование кинетики ключевых реакций начальной стадии гемостаза, формирование кинетической модели.

**Методы и подходы. Подготовка тромбоцитов.** Венозную кровь от доноров собирают в 1/7 объема буфера ACD (2.5% цитрат натрия, 2% D-глюкоза, 1.5% лимонная кислота, 3 мМ EGTA, pH 6.7) и

центрифугируют при 330 g в течение 5 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) центрифугируют при 400 g в течение 5 мин. При проведении экспериментов PRP ресуспендируют в HEPES буфере (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-глюкоза, 10 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM CaCl<sub>2</sub>) с конечной концентрацией тромбоцитов  $1 \times 10^7$  кл/мл.

**Лазерная дифракция, совмещение с флуоресцентным анализом (Патент 2021).** Технология реализуется на лазерном анализаторе «ЛАСКА-ТМФ» («БиоМедСистем» С.-Петербург), в котором осуществляется многоканальная регистрация интенсивности светорассеяния и флуоресценции (частота дискретизации 10 Гц). Детектор малоуглового светорассеивания – 28 фотодиодов в диапазоне углов 0.1-12 градусов. Регистрация флуоресценции – 4 детектора с фильтрами: FL1 (527 нм), FL2 (578 нм), FL3 (625 нм), FL4 692 нм. Длина волны лазера – синий полупроводниковый диодный лазер, 488 нм. Кювета с кварцевыми стенками и рабочим объемом 1 (0.8-2) мл. Мешалка с магнитным приводом и задаваемым диапазоном оборотов – 500-4000 об/мин. Термостатирование кюветного отделения от 10 до 50°C (шаг 0.5°C).

**Нагрузка тромбоцитов кальциевым красителем и регистрация внутриклеточного кальция Ca<sub>i</sub>.** В полученную обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) вносится Fluo-3AM (конечная концентрация – 5мМ) + PluronicF-127 (0.02%). PRP с Fluo-3AM хранится в темноте в течение 50-60 минут. Далее PRP с Fluo-3AM разбавляется HEPES буфером. Динамика изменения Ca<sub>i</sub> регистрируется флуоресценции детектором FL1 (527 нм) [10].

**Результаты и обсуждение.** Основным критерием адекватности экспериментальной модели клеточного гемостаза является ее максимальное приближение к физиологическим условиям, но этому препятствует сама процедура выделения клеток крови. Взятия крови происходит при повреждении сосуда, тем самым сразу активируются пусковые реакции гемостаза. Используются два подхода для их блокирования: а) ингибирование активности тромбина (гепарин, гирудин), б) связывание свободного кальция хелаторами (цитрат, EGTA). При ингибировании тромбина исключается возможность исследовать взаимосвязь коагуляционного и клеточного звена гемостаза, поэтому преимущественно используются хелаторы. При этом также существуют два подхода: или дальше проводить исследования в нерекальцифицированной плазме; или отмыть клетки и ресуспендировать их в буферную среду с кальцием. Оба варианта имеют свои недостатки. При низкой концентрации ионов кальция в среде резко снижается внутриклеточный кальциевый ответ [7], от которого зависит практически все процессы трансформации тромбоцитов (shape change, выброс гранул, агрегация, генерация тромбина). При отмывке тромбоциты теряют свою чувствительность к агонистам; особенно чувствительны к этой процедуре

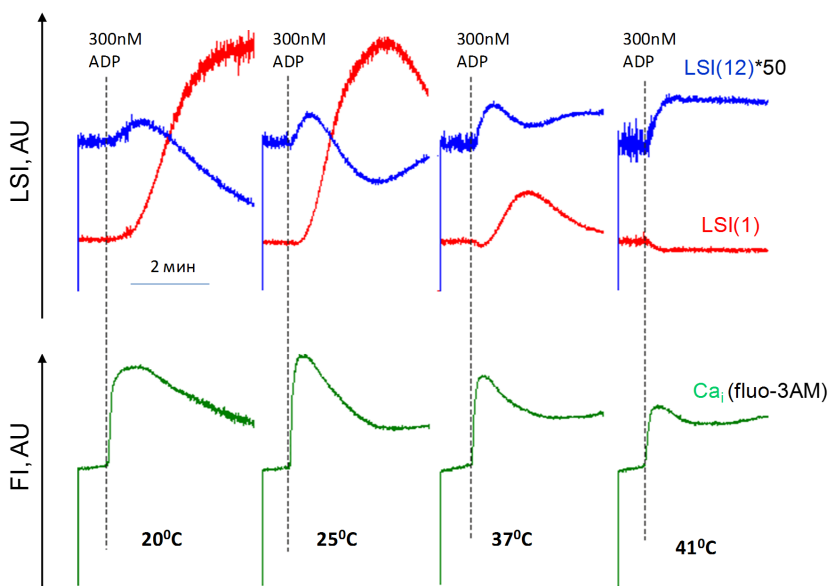
пуриновые рецепторы. В работе предлагается компромиссное решение. Выделение крови происходит с использованием хелаторов (цитрат + EGTA). Хранение осуществляется в обогащенной тромбоцитами плазме (platelet rich plasma, PRP). Перед экспериментом PRP разбавляется в 20 раз HEPES-буферной средой с физиологическим значением pH и концентрацией кальция (2 мМ). При таком разбавлении содержание фибриногена и белков плазмы остается достаточным для агрегации и генерации тромбина, и при этом сохраняется чувствительность к действию агонистов.

Для исследования кинетики ключевых реакций клеточного гемостаза используется новая аналитическая платформа, позволяющая регистрировать и различать такие процессы трансформации тромбоцитов как изменение формы (shape change), агрегация, дезагрегация, свертывание (clot formation). Одновременно с этими процессами осуществляется регистрация внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $Ca_i$ ). На рисунке 1 представлена динамика интенсивности светорассеяния (light scatter intensity – LSI) в углах 1 и 12 градусов: LSI(1) и LSI(12) при действии ADP (300 нМ) на суспензию тромбоцитов; и динамика изменения флуоресценции (FI), отражающая изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $Ca_i$ ). Для клеток, диаметр которых больше длины волны облучения, свет рассеивается преимущественно вперед, и LSI в ближних углах значительно выше, чем в дальних углах; поэтому масштаб для LSI(12) увеличен в 50 раз по сравнению с LSI(1). Начальное быстрое увеличение LSI(12) при внесении ADP обусловлено изменением формы (shape change). Последующее одновременное увеличение LSI(1) и снижение LSI(12) обусловлено агрегацией.

При воздействии небольших доз ADP (100-500 нМ) температура достаточно сильно влияет на кинетику трансформации тромбоцитов, особенно на обратимую агрегацию. При дозе  $[ADP] = 300$  нМ, после «shape change» и начальной агрегации, наблюдается дезагрегация, выраженная, как снижение LSI(1) и увеличение LSI(12). Температура наиболее сильно влияет именно на процесс дезагрегации, с ее увеличением процесс дезагрегации ускоряется. Если при  $t = 25^\circ C$  агрегация достаточно высокая и дезагрегация наблюдается только через несколько минут после развития процесса; то при  $t = 37^\circ C$  агрегация слабо выражена и довольно быстро наблюдается дезагрегация, а при  $t = 41^\circ C$  агрегация отсутствует. Начальное повышение  $Ca_i$  предшествует процессу трансформации клеток (shape change), при этом динамика  $Ca_i$  в первые минуты развития процесса имеет двухфазный характер. Фаза очень быстрого подъема преимущественно связана с активацией  $IP_3$ -каналов, и последующая фаза снижения сигнала  $Ca_i$  обусловленная откачкой кальция из цитоплазмы Са-АТРазами. Повышение температуры значительно влияет



на скорость откачки кальция Са-АТРазами и через 20-30 секунд уровень кальция при 25°C значительно выше чем при 37°C. Начальная скорость агрегации оценивается через 20 секунд после действия ADP, поэтому и оценка влияния Са<sub>i</sub> на процесс агрегации, точнее делать на основании оценки AUC<sub>Ca</sub> (площадь под кривой – the area under the curve) в течение 20 секунд [10]. Именно быстрая откачка кальция предопределяет парадоксальное влияние температуры на агрегацию тромбоцитах, когда при небольших дозах агониста, агрегация увеличивается при снижении температуры.



**Рис. 1.** Динамика интенсивности светорассеяния (light scatter intensity – LSI) в углах 1 и 12 градусов: LSI(1) и LSI(12) и динамика изменения флуоресценции (FI), отражающая изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция (Са<sub>i</sub>) при действии ADP (300 нМ) на суспензию тромбоцитов при температурах 20°C, 25°C, 37°C, 41°C.

При различных дозах агониста (ADP) наблюдается сходная с температурой картина. При физиологической температуре низкие дозы ADP (<100 нМ) вызывают только shape change, повышение концентрации агониста приводит к обратимой агрегации, и только при высоких дозах ADP (>2000 нМ) агрегация становится необратимой. В серии исследований были оценены значения EC<sub>50</sub> (ADP) для реакций изменения формы (shape change), агрегации и изменения внутриклеточного кальция

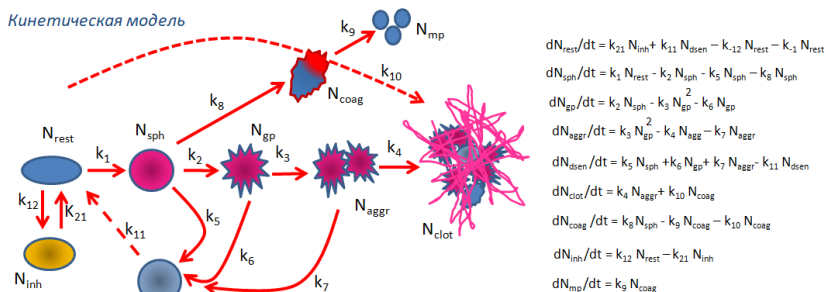
(оцененная по  $AUC_{Ca}$ ) при различных условиях тестирования тромбоцитов [8-10]. В таблице 1 представлены данные при температурах 25, 37, 41 градус, и в условиях ингибирования тромбоцитов илопростом (ilo) и риоцигуатом (riociguat). Илопрост является устойчивым аналогом простагландина  $PGI_2$ , который вызывает активацию сAMP-системы, а риоцигуат является донором NO, вызывающий активацию сGMP-системы. Для тромбоцитов сAMP- и сGMP-являются важнейшими ингибиторными системами, позволяющие сохранять тромбоциты в покойном состоянии при нормальных условиях, когда наблюдается продукция NO и простагландина  $PGI_2$  неповрежденным эндотелием. Значения  $EC_{50}$  при ингибировании значительно выше, чем для контроля, т.о. для активации/агрегации ингибированных тромбоцитов требуется значительно больший стимул.

**Табл. 1.** Значения  $EC_{50}$  для реакций изменения формы (shape change), агрегации и изменения внутриклеточного кальция (оцененная по AUC) при различных условиях тестирования тромбоцитов.

Тест	$EC_{50}$ , нМ shape change	$EC_{50}$ , нМ aggregation	$EC_{50}$ , нМ $Ca_i$ ( $AUC_{Ca}$ )
ADP (41°C)	49.4 ± 8.6	808 ± 61	1156 ± 99
ADP (37°C)	46.4 ± 9.1	594 ± 76	939 ± 39
ADP (25°C)	40.9 ± 9.9	96 ± 16	603 ± 28
ADP (25°C) + Riociguat 1 мкМ	70 ± 14	538 ± 37	
ADP (25°C) + Riociguat 5 мкМ	99 ± 16	894 ± 57	
ADP (25°C) + Riociguat 10 мкМ	113 ± 19	1070 ± 75	
ADP (25°C) + Ilo 0.05 нМ	84 ± 16		
ADP (25°C) + Ilo 0.5 нМ	150 ± 27		
ADP (25°C) + Ilo 1 нМ	217 ± 26		

Исследования показали, что реакции переход клеток от одного фенотипа к другому, происходит при различных дозах агониста, что ожидаемо. Более интересным является то, что реакции могут разветвляться. Внутриклеточный кальций является триггером практически для всех запускаемых реакций гемостаза. Динамика  $Ca_i$  носит сложный характер. Первоначальному повышению кальция в цитозоле ( $Ca_i$ ), вызванному выходом его из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) через IP3R-каналы, противодействуют мембранные АТФазы (PMCA, SERCA) и  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменник (NCX). Они выкачивают кальций из цитозоля во внеклеточное пространство, и назад в ЭПР. В то же время, в зависимости от силы стимула, кальций может начать закачиваться из внеклеточной среды. В ответ на истощение кальция из ЭПР, посредством сенсорной молекулы STIM1 (sensor stromal interaction molecule 1), в плазматической мембране открываются каналы Orai1 - SOC-каналы (store-operated calcium channels). Поэтому в регуляции кальция можно проследить как отрицательные, так положительные обратные связи.

В зависимости от уровня повышения кальция поэтапно реализуется степень вовлечения тромбоцитов в гемостазные реакции [11-13]. Условно, можно сделать следующую градацию: I) при очень незначительном повышении кальция (spiking Ca) реализуется начальная активация - shape change, II) при обратимой кальциевой реакции (transient Ca) происходит активация интегринов  $\alpha IIb\beta 3$  и клетки агрегируют, III) при длительно высоком кальции (prolonged high Ca) тромбоциты становятся прокоагулянтными и способствуют генерации тромбина (или даже распадаются на фосфатидилсериновые микрочастицы). Таким образом, сопоставление динамики кальция с динамикой трансформации клеток позволяет установить важнейшие закономерности системы клеточного гемостаза.



**Рис. 2.** Предполагаемая кинетическая схема тромбоцитарного гемостаза, в рамках концепции изменения фенотипа клеток.

На основании анализа литературы и по нашим исследованиям мы в качестве рабочей гипотезы предлагаем кинетическая модель, представленная на рисунке 2. В условиях гормонального или межклеточного воздействия, при участии систем внутриклеточной трансдукции сигнала, тромбоциты меняют свои функциональные (и поверхностные) свойства и приобретают иной фенотип. В нашей модели мы выделяем восемь фенотипов: 1) “rest” – исходные, не возбужденные клетки (quiescent cells), 2) “inh” – ингибированные клетки, 3) “sph” – сферизованные клетки, в результате начальной реакции «shape change», 4) “gp” – клетки с активированными интегринами  $\alpha IIb\beta 3$  (thrombotic cells), 5) “agg” – агрегированные клетки, агрегаты образованы только через фибриногеновый мостик с интегринами, 6) “coal” – прокоагулянтные клетки (procoagulant cells), 7) “dsen” – рефрактерные «десенсолизованные» клетки, клетки образованные в результате обратимых реакций (например, дезагрегации) и не способные длительное время активироваться, 8) “mp” – тромбоцитарные микрочастицы. Конечным звеном модели является образование тромба из всех клеток,

скрепленного фибриновыми нитями. В модели мы выделяем 13 реакций, часть из которых может быть исследована экспериментально. В дальнейшем предполагается количественная оценка констант выделенных реакций и их зависимость от стимула и состояния внутриклеточной системы тромбоцитов (Ca, cAMP, cGMP).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 23-15-00142).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lebas H., Yahiaoui K., Martos R., Boulaftali Y.* // *Front. Cardiovasc Med.* 2019. 6: 132.
2. *Lee E.C., Cameron S.J.* // *Front. Cardiovasc. Med.* 2017. 4: 67.
3. *van der Meijden P.E.J., Heemskerck J.W.M.* // *Nat. Rev. Cardiol.* 2019. 16(3): 166-79.
4. *Baaten C.C.F.M.J., Ten Cate H., van der Meijden P.E.J., Heemskerck J.W.M.* // *Blood Rev.* 2017. 31(6): 389-99.
5. *Aslan J.E.* // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021. 41(3): 999-1011.
6. *Golebiewska E.M., Poole A.W.* // *Blood Rev.* 2015. 29(3): 153-62.
7. *Walford T., Musa F.I., Harper A.G.* // *Br. J. Pharmacol.* 2016. 173(1): 234-47.
8. *Beck F., Geiger J., Gambaryan S. et al.* // *Blood.* 2017. 129(2): e1-12.
9. *Reiss C., Mindukshev I., Bischoff V. et al.* // *Br. J. Pharmacol.* 2015. 172(21): 5199-210.
10. *Mindukshev I., Fock E., Dobrylko I. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(18): 10667.
11. *Ambily A., Kaiser W.J., Pierro C. et al.* // *Cell Signal.* 2014. 26(3): 502-11.
12. *Volz J., Kusch C., Beck S. et al.* // *J. Clin. Invest.* 2020 Nov 2. 130(11): 6064-79.
13. *Abbasian N., Millington-Burgess S.L., Chabra S. et al.* // *Blood Adv.* 2020. 4(1): 154-64.

## НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ ВЛИЯЮТ НА РЕГУЛЯТОРНОЕ УМЕНЬШЕНИЕ ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ ПОСРЕДСТВОМ АКТИВАЦИИ P2X ПУРИНОРЕЦЕПТОРОВ

*Небесная К.С.<sup>1,2</sup>, Рустамова С.И.<sup>3</sup>, Махмудов А.Р.<sup>1,2</sup>,  
Сабиров Р.З.<sup>3</sup>, Баев А.Ю.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Центр Передовых Технологий, Ташкент, Узбекистан

<sup>2</sup>Национальный Университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,  
Ташкент, Узбекистан

<sup>3</sup>Институт Биофизики и биохимии при НУУз имени Мирзо Улугбека,  
Ташкент, Узбекистан

**Введение.** Неорганические полифосфаты (поли-Ф) – это полимеры, состоящие из остатков ортофосфорной кислоты, соединенных между собой фосфоангидридными макроэргическими связями. Впервые данные

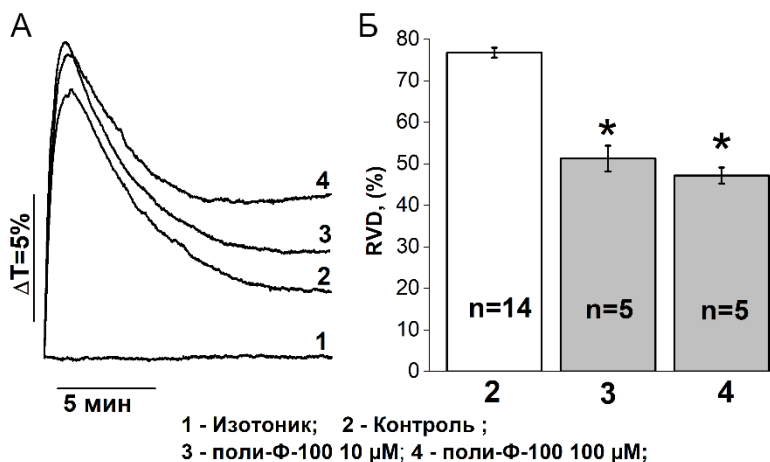
соединения были обнаружены в конце 19-го века немецким ученым Л. Либерманом [1] в дрожжах, однако изучением их свойств и функций начали заниматься лишь во второй половине 20-го века после разработки более точных методов их детекции. На сегодняшний день известно, что поли-Ф содержатся во всех когда-либо тестируемых типах клеток и организмов, однако их концентрация варьирует в зависимости от их местонахождения (тип клеток, вида организма). Установлено, что неорганические полифосфаты участвуют в биоэнергетике клетки [1], процессах воспаления [2], свертывания крови [2], активации ионных каналов [1], модуляции митохондриальной поры неспецифической проводимости (РТР) [1], стабилизации и фолдинге белковых молекул [3], в процессах передачи информации в центральной нервной системе (ЦНС) [4-8] и т.д.

Основываясь на данных о том, что неорганические полифосфаты способны модулировать активность ионных каналов, передавать сигналы внутрь клеток через пуринорецепторы [4,7,8], а также то что поли-Ф являются поли-анионными молекулами, нами было сделано предположение, что поли-Ф могут воздействовать на процессы регуляции клеточного объема так как в регуляции объема клетки вышеуказанные процессы играют важную роль. Способность активной регуляции клеточного объема является важным приспособлением клетки как для обычных физиологических процессов, протекающих на клеточном и тканевом уровне, так и при клеточной смерти (апоптоз, некроз) и опухолевом перерождении клетки. Однако, влияние поли-Ф на этот процесс в настоящее время практически не исследован. Поэтому изучение данного вопроса поможет лучше понять участие поли-Ф в физиологии клетки.

**Результаты и их обсуждение. Влияние неорганических полифосфатов в регуляции клеточного объема тимоцитов.** В ходе экспериментов нами было обнаружено, что поли-Ф-100 (100 остатков ортофосфорной кислоты в цепочке) в концентрациях 10 и 100 мкМ, дозозависимо, подавляют процессы восстановления клеточного объема тимоцитов на ~25.5% и ~29.6% по сравнению с контролем, соответственно (рис. 1). В восстановлении клеточного объема клеток в целом и тимоцитов в частности, после гипоосмотического стресса, основную роль играют ионы калия, хлора, кальция и внутриклеточные органические осмолиты, такие как таурин. Таким образом, поли-Ф теоретически может воздействовать на калиевый, хлорный или кальциевый транспорт.

В следующей серии экспериментов мы заменили все катионы в растворе Рингера на N-метил-D-глюкамин (НМДГ) – катион, создающий необходимое осмотическое давление, но не проходящий через клеточную мембрану, а также внесли в систему 20 мкМ грамицидина Д (ГрД) – катионселективного антибиотика, переносящего ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через

мембрану по градиенту концентрации в обход клеточных систем транспорта (среда «НМДГ-ГрД»). Данные экспериментальные условия исключают участие катионов в регуляции клеточного объема. В данной системе поли-Ф-100 также, дозозависимо, снижал показатель восстановления клеточного объема. Таким образом наши эксперименты показали, что вероятной мишенью поли-Ф в системе регуляции клеточного объема является объем зависимый транспорт анионов, основным компонентом которого в большинстве эукариотических клеток, включая тимоциты, является объем-зависимый анионный канал (VSOR).



**Рис. 1.** Кинетика изменения клеточного объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса в контроле и в присутствии поли-Ф-100 при концентрации 10 мкМ и 100 мкМ. А – Репрезентативные записи регистрации изменения светопропускания суспензии тимоцитов в изотоническом растворе (1) n=3, в контроле – гипоосмотический раствор (2), в присутствии 10 мкМ поли-Ф-100 (3) n=5, и в присутствии 100 мкМ поли-Ф-100 (4) n=5; Б – Статистический анализ данных по восстановлению клеточного объема после набухания в гипотонической среде, в %. \* –  $p \leq 0.05$ .

**Влияние неорганические полифосфатов на внутриклеточную концентрацию кальция в тимоцитах.** Так как эффект поли-Ф на RVD не был связан с изменением транспорта моновалентных катионов, соответственно мы предположили, что влияние поли-Ф на RVD может быть связано с увеличением концентрации внутриклеточного кальция или же посредством влияния поли-Ф на объем зависимый анионный канал (VSOR), который играет основную роль в процессах RVD. Так как поли-Ф является известными агонистами метаболотропных пуринорецепторов, мы решили проверить, влияют ли они на концентрацию внутриклеточного кальция и в тимоцитах.

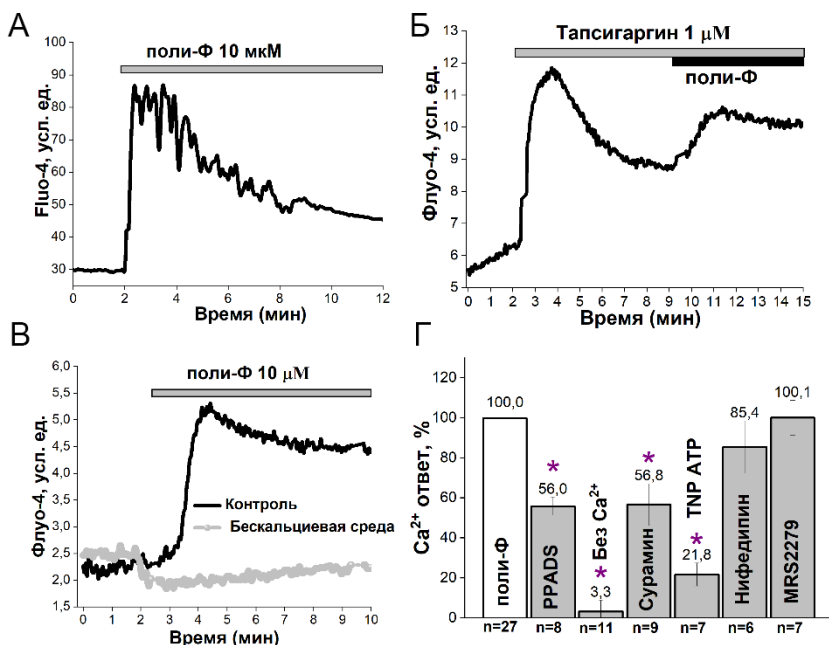
Для изучения влияния поли-Ф на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в тимоцитах нами использовались неорганические полифосфаты со степенью полимеризации 100 (100 остатков ортофосфорной кислоты в цепи). Во всех экспериментах сначала прописывалась «базовая линия», чтобы убедиться, что концентрация внутриклеточного кальция ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) в тимоцитах не меняется спонтанно (рис. 2А). Добавка поли-Ф в среду с тимоцитами, загруженными кальциевым зондом (Fluo-4) вызывала значительное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (рис. 2А). Повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме может происходить при поступлении кальция из межклеточного пространства или из внутриклеточных кальциевых депо. Ранее было показано, что в астроцитах и эндотелиальных клетках поли-Ф может активировать пуринорецепторы типа  $\text{P2Y}_1$ , вследствие чего происходит  $\text{IP}_3$  зависимое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [4,7,8].

Для проверки гипотезы о том, запускает ли поли-Ф элиминацию кальция из эндоплазматического ретикула (ЭР) (как в астроцитах), мы использовали классический ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикула – тапсигаргин (1 мкМ). Добавка тапсигаргина к суспензии митохондрий ингибировала работу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы ЭР и кальций начинал выходить из ЭР в цитоплазму (рис. 2Б). После стабилизации концентрации внутриклеточного кальция на одном уровне нами была сделана добавка поли-Ф, после чего снова наблюдалось увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на фоне опустошенного ЭР.

Эксперименты в бескальциевой среде показали, что добавка поли-Ф к тимоцитам не приводила к увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (рис. 2В). Для того чтобы понять участвуют ли пуринорецепторы в опосредованном полифосфатом увеличении концентрации внутриклеточного кальция, как это наблюдалось в других типах клеток, мы использовали ряд ингибиторов пуринорецепторов и кальциевых каналов. Наши эксперименты показали, что сурамин, в концентрации 100 мкМ значительно, но не полностью, снижал поли-Ф зависимое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (рис. 2Б и Г). Применение ингибитора  $\text{P2X}$  рецепторов TNP-АТФ (30 мкМ) практически полностью подавляло поли-Ф индуцированное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , лишь в некоторых экспериментах мы наблюдали незначительных ответ на фоне TNP-АТФ (рис. 2В и Г). Другой ингибитор  $\text{P2X}$  пуринорецепторов PPADS, также снижал эффект поли-Ф, однако его эффект был не таким значительным как TNP-АТФ или же эффект бескальциевой среды (рис. 2Г). Стоит отметить, что несмотря на то, что PPADS считается ингибитором  $\text{P2X}$  пуринорецепторов, его ингибирующая активность проявляется также и с  $\text{P2Y}_2$  ( $\text{IC}_{50} \sim 0.9$  мМ) и  $\text{P2Y}_4$  ( $\text{IC}_{50} \sim 15$  мМ), но в более высоких концентрациях.

Несмотря на то, что эффект поли-Ф полностью подавлялся инкубированием клеток в бескальциевой среде, ни один из ингибиторов широкого спектра действия (сурамин, PPADS), а также селективный

ингибитор P2X пуринорецепторов не подавляли эффект поли-Ф на 100 %. В связи с этим мы решили применить селективный ингибитор P2Y<sub>1</sub> – MRS2279, который практически полностью подавлял эффект поли-Ф в астроцитах [4]. Однако применение MRS2279 (50 мкМ) не повлияло на эффект поли-Ф в тимоцитах (рис. 2Г).



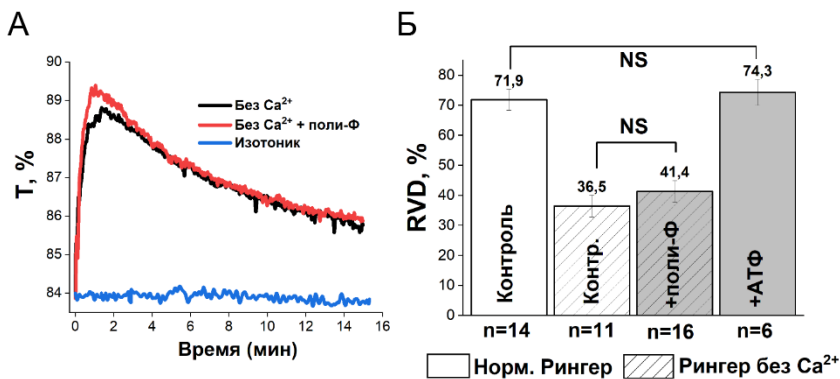
**Рис. 2.** Влияние поли-Ф на концентрацию внутриклеточного кальция в суспензии тимоцитов. А – Добавка неорганических полифосфатов к суспензии тимоцитов вызывает значительное увеличение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (n = 27); Б – Эффект поли-Ф на фоне опустошенного эндоплазматического ретикулума, посредством 1 мкМ тапсигаргина (n = 7); В – Эффект поли-Ф в среде, не содержащей Ca<sup>2+</sup> – репрезентативные записи экспериментов; Г – Эффект поли-Ф значительно снижался в присутствии 30 мкМ PPADS (n = 8), 100 мкМ сурамина (n = 9), 30 мкМ TNP-АТР (n = 7) и в бескальциевой среде (n = 11), однако нифедипин (20 мкМ) и MRS2279 (50 мкМ) не влияли на поли-Ф индуцируемое увеличение концентрации внутриклеточного кальция в тимоцитах; \* – p ≤ 0.001.

В недавней работе Gawrґ R. с соавторами показали, что внеклеточный поли-Ф в комбинации с ионами кальция может оказывать анаболические эффекты в хондроцитах, за счет увеличения концентрации внутриклеточного кальция [9]. Данные эффекты зависели от ингибиторов потенциал чувствительных кальциевых каналов и каналов, активируемых



растяжением, нифедипина и гадолиния, соответственно [9]. В связи с этим нами были проведены эксперименты с нифедипином. Применение нифедипина не оказало значительного влияния на поли-Ф зависимое увеличение внутриклеточного кальция в тимоцитах (рис. 2Г).

В связи с тем, что нами было обнаружено, что поли-Ф запускает вход внеклеточного кальция, вероятно через активацию ионотропных P2X пуринорецепторов, мы решили проверить, влияет ли эффект поли-Ф на RVD в зависимости от наличия внеклеточного кальция. В ходе экспериментов нами было обнаружено, что в бескальциевой среде регуляторное восстановление клеточного объема тимоцитов в ответ на гипосмотический шок происходит лишь на 36.5%, что значительно отличается от RVD тимоцитов в нормальном растворе Рингера (рис. 3А и Б). В присутствии 10  $\mu\text{M}$  поли-Ф RVD тимоцитов в бескальциевой среде составило 41.4%, что не имело статистической значимости по сравнению с контролем в бескальциевой среде (рис. 3А и Б).



**Рис. 3.** Влияние поли-Ф и АТФ на регуляторное восстановление клеточного объема. А – Добавка поли-Ф в концентрации 10 мкМ не приводила к изменению RVD в растворе Рингера, не содержащим Ca<sup>2+</sup>, репрезентативная пропись эксперимента; Б – Добавка поли-Ф в концентрации 10 мкМ не приводила к изменению RVD в растворе Рингера не содержащим Ca<sup>2+</sup>, добавка 1 мМ АТФ не влияла на процессы RVD в нормальном растворе Рингера. NS – изменения не значительны.

В связи с тем, что поли-Ф вероятнее всего оказывает влияние на RVD через активацию P2X пуринорецепторов, мы решили изучить влияние АТФ – естественного агониста пуринорецепторов на RVD. Наши эксперименты показали, что АТФ в концентрации 1 мМ (в нормальном растворе Рингера) не оказывал значительного влияния на процессы RVD (рис. 3Б).

**Заключение.** В данном исследовании нами впервые было показано, что неорганические полифосфаты способны модулировать процессы регуляторного уменьшения клеточного объема тимоцитов, за счет активации пуринорецепторов и увеличения концентрации внутриклеточного кальция. Однако в дальнейших исследованиях, все еще предстоит выяснить, приводит ли это к запуску физиологических или патологических процессов

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Baev A.Y., Abramov A.Y.* // Prog. Mol. Subcell. Biol. 2022. 61: 1-13.
2. *Muller W.E.G., Schroder H.C., Wang X.* // Chem. Rev. 2019. 119(24): 12337-74.
3. *Xie L., Jakob U.* // J. Biol. Chem. 2019. 294(6): 2180-90.
4. *Holmstrom K.M. et al.* // Nat. Commun. 2013. 4: 1362.
5. *Angelova P.R. et al.* // Biochem. Soc. Trans. 2016. 44(1): 40-5.
6. *Baev A.Y., Angelova P.R., Abramov A.Y.* // In: Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells. *Kulakovskaya T., Pavlov E., Dedkova E.N.*, Eds. 2016. Springer International Publishing: 115-21.
7. *Angelova P.R. et al.* // Glia. 2018. 66(10): 2126-36.
8. *Maiolino M. et al.* // J. Neurosci. 2019. 39(31): 6038-48.
9. *Gawri R., Bielecki R., Salter E.W. et al.* // J. Orthop. Res. 2022. 40(2): 310-22.

## ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛИНГА В МСК В ОТВЕТ НА ПАРАТГОРМОН

*Николаев М.Ю.<sup>1</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>,  
Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>, Воронцова М.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Мультипотентные стромальные клетки (МСК) отвечают за обновление и регенерацию кости путем дифференцировки в остеобласты. Также МСК могут дифференцироваться в хондроциты, адипоциты [1]. Важнейшим фактором, определяющим связь между костным анаболизмом и катаболизмом, является паратиреоидный гормон [2]. Основным рецептором ПТГ, представленным на МСК, является ПТГ1R. ПТГ1R активирует два ключевых сигнальных пути, которые находятся в состоянии динамического равновесия друг с другом [3]:

1. цАМФ-зависимый сигнальный каскад, запускаемый  $\alpha_s$  субъединицей тримерного G-белка, приводящий к активации аденилатциклазы; считается, что данный путь опосредует костный анаболизм;

2.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый сигнальный путь, начинающийся с  $\text{G}\alpha_{q/11}$  субъединицы, активирующий фосфолипазу  $\text{C}\beta$ ; инициирует костный катаболизм [4]. Понимание молекулярных механизмов переключения между этими двумя сигнальными путями открывает новые перспективы в лечении остеопороза и регенеративной медицине.

В предыдущих работах нами была выявлена гетерогенность сигнальных ответов МСК на ПТГ [5,6], а также зависимость формата кальциевых ответов от источника выделения клеток [7]. Культуры МСК, выделенные из надкостницы, в ответ на действие ПТГ отвечают преимущественно фосфоинозитид-зависимыми осциллирующими кальциевыми ответами, при этом остеогенная дифференцировка подавляется. Напротив, культуры МСК, выделенные из жировой ткани, отвечают преимущественно длительным цАМФ-зависимым повышением внутриклеточного уровня кальция, что ассоциировано с про-osteогенным эффектом [3]. Использование ингибиторов фосфолипазы С (U73122) и ингибитора аденилатциклазы (SQ22536) приводило к подавлению соответствующего типа ответа и активации альтернативного, а также к изменению влияния ПТГ на дифференцировку клеток [3]. В данной работе с помощью ингибиторного анализа мы изучали вклад отдельных участников сигнальных каскадов аденилатциклазы и фосфолипазы С в регуляции ответов МСК на ПТГ.

**Материалы и методы.** Для экспериментов использовались МСК, полученные из подкожной жировой ткани живота и из надкостницы, две локации клеток преимущественно выделялись из одного донора. Клеточные культуры вели в AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащей 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone) и 1% раствор антибиотика, при температуре  $37^\circ\text{C}$  в инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$ . Пересаживали клетки с помощью растворов Версена и HyQTase (HyClone) при достижении конfluenceности 80%. Функциональная активность рецепторов ПТГ на МСК исследовалась при помощи детекции изменений внутриклеточного уровня кальция прижизненно на уровне одиночных клеток с использованием кальциевого красителя Fluo-8. Ответы МСК на ПТГ (1 мкмоль/л) регистрировались на уровне одиночных клеток. За день до эксперимента клетки высаживались на 48-луночный планшет с 30% конfluenceностью. За час эксперимента к клеткам добавляли краситель Fluo8, а за 15 минут добавляли ингибиторы, которые повторно вносились вместе с ПТГ. В ходе экспериментов использовались ингибитор протейкиназы А (ПКА – ингибитор N89, концентрация 1 мкмоль/л), ингибитор лизосомального подтекания кальция (trans-Ned 19, концентрация 100 мкмоль/л), антагонист цАДФР, активирующий высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) через рианодиновые каналы (8-Br-cADPR, концентрация 4 мкмоль/л), активатор ПКА (8-cpt-cAMP, концентрация 500 мкмоль/л), активатор

адинилатциклазы (форсколин, концентрация 50 мкмоль/л), ингибитор ПКС (1-O-Hexadecyl-2-O-acetyl-sn-glycerol, концентрация 40 мкмоль/л), блокатор рианодиновых рецепторов (рианодин, концентрация 2 мкмоль/л), блокатор кальциевых каналов L-типа (нифедипин, концентрация 10 мкмоль/л), блокатор инозитол-1,4,5-трисфосфатных рецепторов (ИЗФ рецепторы – ингибитор 2APB, концентрация 50 мкмоль/л). Для каждого эксперимента брались по 3 культуры клеток от разных доноров, с каждой культурой проводилось не менее чем по 3 эксперимента с добавлением ингибитора, а также контрольный эксперимент с добавлением только ПТГ. Полученные результаты анализировались по разработанной методике с помощью программы Fiji ImageJ:

1. При помощи функции Threshold были идентифицированы зоны с достаточным уровнем флуоресценции (клетки).

2. Далее при помощи функции Analyze Particles производился отбор учитываемых клеток – по размеру (от 50 пикселей) и по форме (Circularity 0-0.85).

3. Подходящие по критериям отбора клетки добавлялись в ROI, для них измеряли интенсивность свечения (Mean gray value).

4. Дальнейшая обработка полученных данных производилась в программе Excel. Проводился анализ характера изменения свечения клеток. Критерием, определяющим наличие кальциевого ответа, было принято увеличение яркости пикселей в пределах ROI на 30%.

5. Для устранения артефактных ответов производилась нормировка яркости отвечающих клеток с помощью деления на среднюю яркость выбранной группы не отвечающих клеток.

**Результаты.** В МСК, выделенных как из жировой ткани, так и из надкостницы плавный прирост внутриклеточного кальция уменьшался при использовании рианодина, блокирующего рианодиновые каналы и тем самым предотвращал высвобождение кальция из ЭПР. Эффект рианодина на осцилляторные ответы отличался в клетках, выделенных из подкожного жира брюшной стенки и надкостницы. Происходило увеличение ответов данного типа в МСК из жира живота и снижение в клетках из надкостницы. Это может свидетельствовать о разных механизмах кальциевых ответов в клетках из разных локализаций. Результаты данных опытов подтверждены дополнительно экспериментами с антагонистом цАДФР, который не блокирует сами рианодиновые рецепторы, а предотвращает их потенциацию с помощью цАДФР. Из ЭПР кальций может поступать в клетку через ИЗФР. В ходе экспериментов установлено, что во всех типах кальциевых ответов задействованы ИЗФР, так как при использовании блокатора ИЗФР (2APB) изменение уровня кальция в цитоплазме перестало наблюдаться. Из внеклеточного пространства одним из возможных путей поступления кальция являются кальциевые каналы L-типа. Блокатор этих каналов

нифедипин приводил к увеличению осцилляторных ответов в клетках из обеих локализаций.

Одним из путей влияния на кальциевую сигнализацию по приведенным механизмам является цАМФ-зависимый путь. Большинство молекулярных механизмов регулирования завязано на активацию ПКА и последующего фосфорилирования ионных каналов с изменением их пропускной способности. Также были обнаружены указания на осуществление механизма запуска кальциевых осцилляций с участием цАМФ – прямое влияние цАМФ на ИЗФР [8]. Для определения механизма цАМФ-зависимого пути были использованы – активатор ПКА форсколин, проникающий в клетку аналог цАМФ (8-cpt-cAMP) и ингибитор протеин киназы А (Н89). Ингибирование цАМФ-зависимой протеинкиназы (ПКА) с помощью Н89 приводило к увеличению числа осциллирующих клеток как в МСК из надкостницы, так и в МСК из жира. Этот факт подтверждает ранее показанную конкуренцию между фосфоинозитид-зависимыми осцилляциями кальция с одной стороны и плавным цАМФ-зависимым приростом внутриклеточного уровня кальция с другой [3]. Форсколин и аналог цАМФ не имели противоположного действия, что может быть объяснено неспецифическим действием активатора и наличием дополнительных прямых путей активации ИЗФР.

Таким образом, ПТГ активировал различные преимущественные пути кальциевой сигнализации в зависимости от ткани, из которой были выделены МСК. Разные типы кальциевых ответов зависели от различных ресурсов для мобилизации внутриклеточного кальция. В формировании плавного кальциевого ответа важную роль играли рיאодиновые рецепторы, впускающие кальций из ЭПР. Осцилляторные ответы активировались при участии фосфоинозитидного обмена и ингибировались при участии ПКА. Также они были негативно связаны с поступлением кальция извне клетки через медленные кальциевые каналы L-типа. ИЗФР задействовались во всех типах кальциевых ответов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-75-30007.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bruder S.P., Fink D.J., Caplan A.I. // J. Cell. Biochem. 1994. 56(3): 283-94.
2. Glukhova X.A., Prusakova O.V., Trizna JA. et al. // Curr. Pharm. Des, 2016. 22(7): 870-8.
3. Kulebyakin K. et al. // Cells. 2022. 11(21): 3519.
4. Bastepe M., Turan S., He Q. // Journal of Molecular Endocrinology. 2017. 58(4): R203-24.
5. Котова П.Д. и др. // Биологические мембраны. 2013. 30(5-6): 1-8.
6. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21(12): 1-14.
7. Воронцова М.В. и др. // Гены и клетки. 2019. 14: 57.
8. Tovey S.C. et al. // J. Cell Biol. 2008. 183(2): 297-311.

# ОСЦИЛЛЯЦИИ КОЖНОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ, КАЛЬЦИЯ И NO В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У МЫШЕЙ

*Серов Д.А.<sup>1,2</sup>, Асташев М.Е.<sup>1,2</sup>, Шайхутдинова Э.Р.<sup>3</sup>,  
Северюхина М.С.<sup>3</sup>, Танканага А.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

**Введение.** Сахарный диабет второго типа (СД2Т) – это метаболическое заболевание, характеризующееся нечувствительностью клеток организма к инсулину (инсулинорезистентностью), снижением секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы, нарушением функционирования альфа-клеток поджелудочной железы [1,2]. Указанные процессы затрудняют транспорт глюкозы в клетки мышц, печени и других органов и тканей [3]. По данным ВОЗ, в мире свыше 280 миллионов человек больны СД2Т а прогнозируемое число людей с СД2Т на 2030 год превышает 430 миллионов [4,5]. Как правило, симптомы СД2Т типа не проявляются сразу в острой форме, а ему предшествует скрытая фаза преддиабета [6]. Фаза преддиабета СД2Т лучше поддается терапии, многих осложнений можно избежать за счёт коррекции образа жизни и диеты пациента [7], поэтому своевременная ранняя диагностика СД2Т играет важную роль в обеспечении благополучия людей с предпосылками к развитию СД2Т. Лазерная Допплеровская флоуметрия (ЛДФ) является неинвазивным методом исследования состояния микрососудистого русла [8]. Широкая группа осложнений СД2Т ассоциирована с нарушением функционирования макро- и микрососудов: гипертония, ишемическая болезнь сердца, инсульты, диабетическая ретинопатия, нефропатия, «диабетическая стопа» и т.д. [9], поэтому ЛДФ может оказаться информативным методом ранней диагностики СД 2 типа. В литературе имеются данные о взаимосвязи микрососудистых осложнений диабета с развитием эндотелиальной дисфункции [10,11]. Потенциальными механизмами развития эндотелиальной дисфункции и, следовательно, микрососудистых осложнений СД2Т, являются нарушения кальциевого гомеостаза клеток и продукции оксида азота (NO) [12,13]. Ранее нами была показана связь между осцилляциями цитоплазматических концентраций кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) и NO ( $[NO]_i$ ) в эндотелиоцитах и колебаниями кожной микроциркуляции (SBP, skin blood perfusion). Детальное изучение молекулярных механизмов развития эндотелиальной дисфункции при СД2Т позволит найти новые терапевтические подходы для

предотвращения развития осложнений СД2Т, а также расширить применение метода ЛДФ в ранней диагностике СД2Т. Ввиду вышесказанного, целью настоящей работы было исследование взаимосвязи колебаний SBP и осцилляций  $[Ca^{2+}]_i$  и  $[NO]$  в эндотелиоцитах в модели СД2Т у мышей в покое и при физиологическом тесте – тепловой пробе.

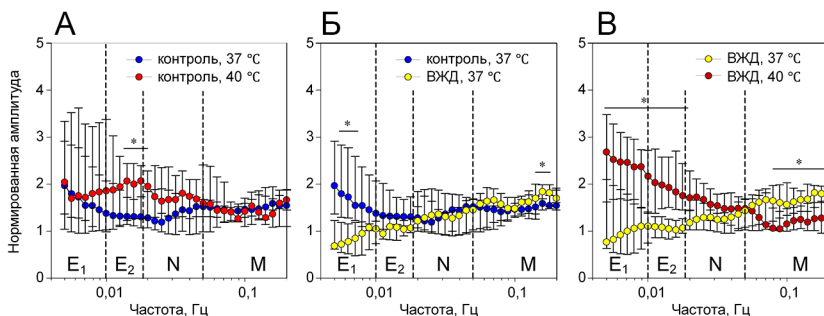
**Материалы и методы.** В работе использованы самцы мышей (*Mus musculus*) линии C57BL/6j. Метаболический синдром индуцировали у мышей в возрасте 6-7 недель путем их содержания на высокожировой диете в течение 14 недель (группа ВЖД). Контролем служили животные, которых содержали на стандартной диете. Высокожировая диета состояла из стандартного корма с добавлением топленого свиного сала (пищевая ценность 306 ккал/100 г, 45% жиров, 35% углеводов, 20% белков). Развитие метаболических нарушений подтверждали глюкометрией (1-й и 57-й день диеты), мониторингом массы тела животных, глюкозотолерантным или инсулинорезистентным тестами (на 15-й и 16-й неделе диеты). Регистрацию колебаний SBP мышей проводили с использованием одноканального лазерного анализатора ЛАКК-01 (Лазма, Россия) на подушечке задней лапы животного в течение 15 минут в состоянии покоя и 20 мин при нагреве до 40 °С (тепловая проба). Животные были предварительно обездвижены с помощью комбинированного инъекционно-газового наркоза «Золетил-закись азота» [14]. Состояние животных во время измерений контролировали по записям ЭКГ, частоте дыхания и температуре тела. Частота дискретизации сигналов ЭКГ и кожной перфузии составляла 500 Гц.

Эндотелиоциты из микрососудов кожи мышцы получали с помощью ферментативной обработки диспазой и коллагеназой II типа с последующей седиментации на градиенте плотности перколла [15,16]. Валидацию полученной культуры выполняли иммунофлуоресцентным окрашиванием CD31. В исследовании использовали клетки 5-6 пассажей. Клетки рассеивали на предварительно прокалённые и покрытые 0.1% желатином круглые покровные стёкла и культивировали до 100% конfluентности. Гипергликемию инициировали инкубацией клеток с 22 мМ глюкозы в течение 24 ч. Контроль инкубировали с 5 мМ глюкозы. После инкубации клетки окрашивали зондами Fura-2 AM 2 мкМ и DAF-FM 2 мкМ (ThermoFisher, США) в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Регистрацию флуоресценции выполняли на разработанной нами системе для имиджинга. Регистрацию проводили в течение 15 мин при температуре 37°С и 20 мин при 40°С (тепловая проба). Настройки времени экспозиции, мощности освещения и усиления камеры были постоянными для всех образцов.

Спектральный анализ полученных временных рядов выполняли методом адаптивного вейвлет-преобразования. Статистическую

значимость различий определяли с помощью парного критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Данные представлены в виде медиан и квартилей.

**Результаты и обсуждение.** Тепловая проба на фоне стандартной диеты вызывала увеличение амплитуды колебаний SBP в интервале NO-зависимого эндотелиального ритма (рис. 1А), что принципиально согласуется с нашими данными и данными других авторов [17,18]. Гипергликемия снижала амплитуду колебаний SBP в области NO-независимого эндотелиального ритма (рис. 1Б), что согласуется с данными, полученными ранее на человеке [19,20]. Тепловая проба увеличивала амплитуду колебаний SBP во всей области эндотелиального ритма, а также снижала её в области миогенного (рис. 1В), что не наблюдалось у мышей на стандартной диете (рис. 1А), следовательно, в перспективе, тепловая проба может быть применена для ранней диагностики СД2Т.



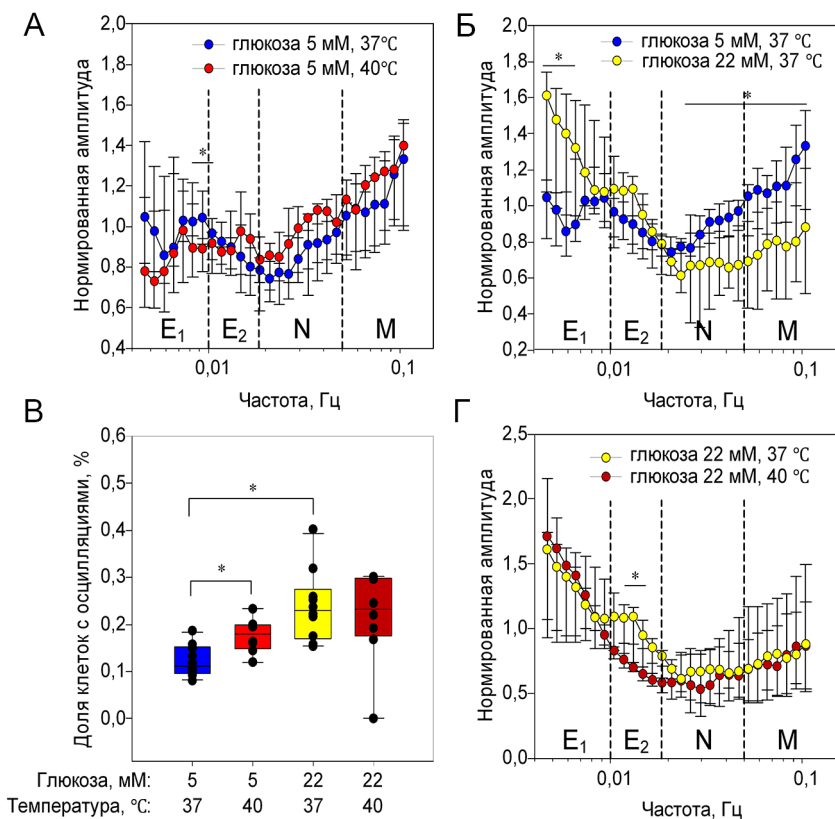
**Рис. 1.** Амплитудно-частотные характеристики колебаний скорости кожной микроциркуляции мышей на фоне стандартной диеты (контроль) в покое и при тепловой пробе (А), на фоне стандартной диеты и высокожировой диеты (ВЖД) в покое (Б) и на фоне ВЖД в покое и при тепловой пробе (В). \* –  $p < 0.05$  ( $n = 8$ ) по критерию Вилкоксона (А, В) и Манна-Уитни (Б). E1 – NO-независимый, E2 – NO-зависимый, N – нейрогенный M – миогенный ритмы.

Тепловая проба снижала амплитуду колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  в эндотелиоцитах сосудов кожи мыши в частотном интервале NO-независимого эндотелиального ритма (рис. 2А), что согласуется с ранее полученными данными для эндотелиоцитов, выделенных из лёгких мыши [21]. Гипергликемия уменьшает амплитуду колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  в интервале NO-независимого эндотелиального ритма (рис. 2Б). Это согласуется с литературными данными об изменении кальциевого гомеостаза клеток эндотелия при СД2Т [12,22].

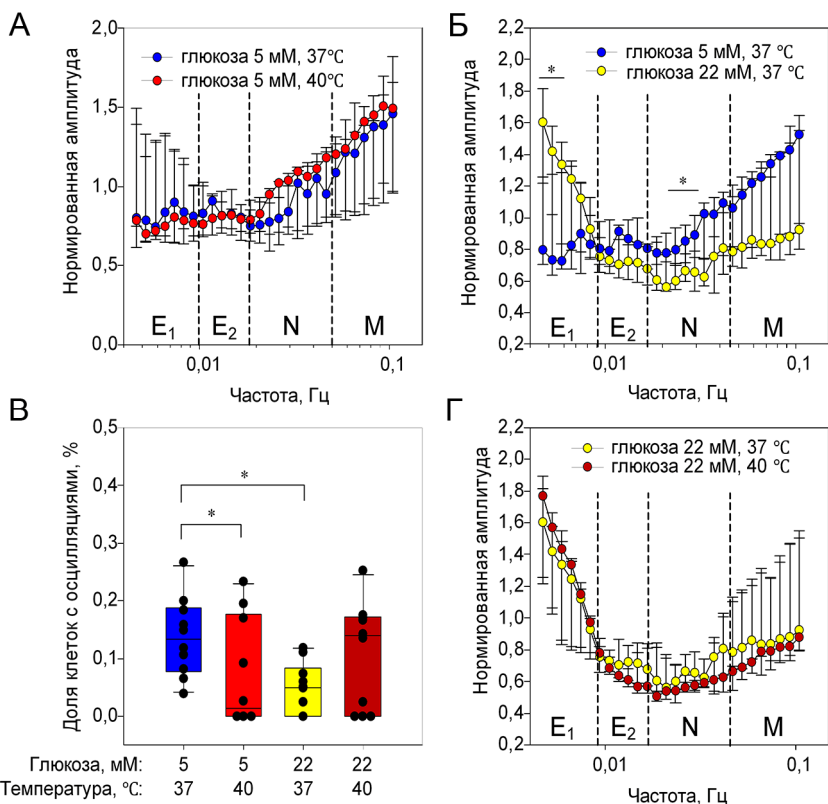
Тепловая проба на фоне гипергликемии увеличивала амплитуду колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  в NO-зависимом эндотелиальном ритме (рис. 2Г).



Полученные данные согласуются с ранее полученными данными о модифицирующем действии температуры и гипергликемии на кальциевую сигнализацию [21,23-25]. Кроме эффекта на спектральные характеристики, гипергликемия или тепловая проба увеличивали долю клеток с осцилляциями  $[Ca^{2+}]_i$ , по сравнению с контролем (рис. 2В). Тепловая проба на фоне гипергликемии не оказывала дополнительного эффекта на число клеток с осцилляциями  $[Ca^{2+}]_i$ , что может указывать на «насыщение» популяции по клеткам с осцилляциями  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Рис. 2.** Амплитудно-частотные характеристики колебаний концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в цитоплазме эндотелиоцитов на фоне 5 мМ глюкозы (контроль) в покое и при тепловой пробе (А), на фоне 5 и 22 мМ глюкозы в покое (Б) и на фоне 22 мМ глюкозы (гипергликемия) в покое и при тепловой пробе (Г). Доли клеток с колебаниями кальция в разных вариантах опыта (В). \* –  $p < 0.05$  ( $n = 8$ ) по критерию Вилкоксона (А, Г) и Манна-Уитни (Б, В).  $E_1$  – NO-независимый,  $E_2$  – NO-зависимый, N – нейрогенный M – миогенный ритмы.



**Рис. 3.** Амплитудно-частотные характеристики колебаний концентрации оксида азота ( $[NO]_i$ ) в цитоплазме эндотелиоцитов на фоне 5 мМ глюкозы (контроль) в покое и при тепловой пробе (А), на фоне 5 и 22 мМ глюкозы в покое (Б), и на фоне 22 мМ глюкозы (гипергликемия) в покое и при тепловой пробе (Г). Доли клеток с колебаниями кальция в разных вариантах опыта (В). \* –  $p < 0.05$  ( $n = 8$ ) по критерию Вилкоксона (А, Г) и Манна-Уитни (Б, В).  $E_1$  – NO-независимый,  $E_2$  – NO-зависимый, N – нейрогенный M – миогенный ритмы.

Тепловая проба не изменила спектральные характеристики осцилляций  $[NO]_i$  в цитоплазме эндотелиоцитов из кожи мыши (рис. 3А). Полученный результат отличается от данных, полученных для эндотелиоцитов из лёгких, и может объясняться различиями в экспрессии NO-синтазы в эндотелиоцитах из разных источников [26]. Гипергликемия увеличивала амплитуду осцилляций  $[NO]_i$  в диапазонах миогенного и NO-независимого эндотелиального ритмов (рис. 3Б). Это согласуется с литературными данными об aberrantной регуляции активности NO-синтазы при гипергликемии [4]. Тепловая проба не изменяла амплитудно-частотные характеристики колебаний концентрации NO (рис. 3Г).

Тепловая проба в контроле снижала число клеток с осцилляциями NO по сравнению с покоем (рис. 3В). Этот результат принципиально согласуется с полученным ранее данными [21]. Гипергликемия снижала число клеток с осцилляциями NO по сравнению с контролем почти в 3 раза, что может указывать на ингибирование NO-синтазы при гипергликемии [27]. Тепловая проба на фоне гипергликемии не влияла на число клеток с осцилляциями NO, что согласуется с отсутствием эффектов на амплитудно-частотные характеристики колебаний NO.

**Выводы:** у мышей с моделированным состоянием СД2Т типа выявлено снижение амплитуды колебаний кожной микроциркуляции в эндотелиальном ритме, а так же измененный ответ на тепловую пробу. Возможные механизмы обнаруженных явлений – модификация кальциевого гомеостаза и активности NO-синтазы в эндотелиоцитах микрососудов, изменение числа клеток с осцилляциями концентраций кальция и NO на фоне гипергликемии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 22-15-00215.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Robertson R.P. // J. Lab. Clin. Med. 1995. 125(5): 560-4.
2. Fujioka K. // JAAPA. 2007. 20(12): 3-8.
3. Reed J., Bain S., Kanamarlapudi V. // Diabetes Metab. Syndr. Obes. 2021. 14: 3567-602.
4. Olokoba A.B., Obateru O.A., Olokoba L.B. // Oman Med. J. 2012. 27(4): 269-73.
5. Chamnan P., Simmons R., Forouhi N. et al. // Diabetes Care. 2011. 34(4): 950-6.
6. Bansal N. // World J. Diabetes. 2015. 6(2): 296-303.
7. Tuso P. // Perm. J. 2014. 18(3): 88-93.
8. Chao C.Y.L., Cheing G.L.Y. // Diabetes Metab Res Rev. 2009. 25(7): 604-14.
9. Farmaki P., Damaskos C., Garmpis N. et al. // Curr. Cardiol Rev. 2021. 16(4): 249-51.
10. Nguyen T.T., Shaw J.E., Robinson C. et al. // Diabetes Care. 2011. 34(6): 1389-93.
11. Muris D.M.J., Houben A.J.H.M., Schram MT, Stehouwer C.D.A. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012. 32(12): 3082-94.
12. Fernández-Velasco M., Ruiz-Hurtado G., Gómez A.M., Rueda A. // Cell Calcium. 2014. 56(5): 397-407.
13. Tessari P., Cecchet D., Cosma A. et al. // Diabetes. 2010. 59(9): 2152-9.
14. Astashev M.E., Serov D.A., Tankanag A.V. // Skin Res. Technol. 2019. 25(1): 40-6.
15. Hou H., Li J., Zhou L. et al. // Cell Biol. Int. 2020. 44(12): 2588-97.
16. Cha S.T., Talavera D., Demir E. et al. // Microvasc. Res. 2005. 70(3): 198-204.
17. Geyer M.J., Jan Y.-K., Brienza D.M., Boninger ML. // J. Rehabil. Res. Dev. 2004. 41(6A). 797-806.
18. Красников Г.В., Танканга А.В., Коняева Т.Н. и др. // Росс. Физиол. Ж. 2007. 93(4): 394-401.
19. Filina M.A., Potapova E.V., Makovik I.N. et al. // Human Physiology. 2018. 43(6): 693-9.

20. Tikhonova I.V., Tankanag A.V., Guseva I.E., Grinevich A.A. // Biomed. Signal Proces. 2023. 79(2): 104222
21. Serov D, Tankanag A, Astashev M. // Cell Biol. Int. 2021. 46(3): 427-42.
22. Berra-Romani R., Guzmán-Silva A., Vargaz-Guadarrama A. et al.// Int. J. Mol. Sci. 2019. 21(1): 21010250.
23. Pandey S., Li L., Tan H. et al. // PLoS ONE. 2014. 9(12):0111083.
24. Paltauf-Doburzynska J., Malli R., Graier W.F. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2004. 44(4): 423-36.
25. Kimura C., Oike M., Ito Y. // Circ. Res. 1998. 82(6): 677-85.
26. Heaps C., Bray J., McIntosh A., Schroeder F. // Microvasc. Res. 2019. 122: 34-40.
27. Du X.L., Edelstein D., Dimmeler S. et al. // J. Clin. Invest. 2001. 108(9): 1341-8.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ И ФОСФОЛИПАЗЫ С В ПТГ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК

*Усачев В.А.<sup>1</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>, Волошин Н.С.<sup>1</sup>,  
Зубарев И.В.<sup>1</sup>, Николаев М.Ю.<sup>1</sup>, Воронцова М.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** В течение жизни у человека постоянно происходят процессы ремоделирования костей. За этот период костная ткань полностью обновляется несколько раз. Основную роль в этом процессе играет баланс между резорбцией костной ткани, которую осуществляют остеокласты, и закладкой новой ткани, которую производят остеобласты. Нарушение этого баланса может привести к развитию серьезных заболеваний, таких как остеопороз, синдром Маккуна-Албрайта, болезнь Паджета и другие [1]. Для поддержания баланса между резорбцией и закладкой костной ткани важны эндокринные и паракринные сигналы, которые регулируют активность остеобластов и остеокластов. Один из главных гормонов, который влияет на метаболизм костной ткани, – это паратиреоидный гормон (ПТГ), который вырабатывается клетками паращитовидной железы.

Паратиреоидный гормон (ПТГ) – это пептид, состоящий из 84 аминокислотных остатков, который играет важную роль в регулировании фосфорно-кальциевого обмена и метаболизма костной ткани. Его ключевые эффекты проявляются через связывание с рецепторами в почках и костной ткани, хотя и другие ткани организма также могут экспрессировать рецепторы к ПТГ [2], что может опосредовать нежелательные побочные эффекты, описанные при его использовании в качестве лекарственного препарата. Связывание ПТГ с его рецептором

может приводить к запуску как аденилатциклазной сигнализации, так и сигнализации, связанной с фосфолипазой С, что может реализоваться через конкуренцию между различными G-белками за связывание с рецептором [3].

В костной ткани ПТГ вызывает разнообразные эффекты, так как разные группы клеток реагируют на него по-разному. Он оказывает прямой эффект на остеоциты и остеобласты [4], а также регулирует резидентные стволовые клетки кости, которые являются предшественниками остеобластов [5], но его действие на остеокласты опосредовано [6]. Постоянное введение ПТГ в больших дозах может усилить процессы резорбции кости, тогда как его интермиттирующее введение стимулирует костеобразование [7]. Таким образом, ПТГ может играть роль координатора баланса в процессах ремоделирования кости, но молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов, до конца не изучены.

**Результаты.** Для выяснения влияния ПТГ на остеогенную дифференцировку МСК мы регистрировали внеклеточные отложения кальция при помощи иммуногистохимического окрашивания красителем Ализариновый красный, а также при помощи ОТ-ПЦР – экспрессию генов-маркеров остеогенеза. Мы установили, что ПТГ разнонаправленно влияет на остеогенную дифференцировку МСК, выделенных из различных организменных депо. С одной стороны, он оказывает выраженное проостеогенное действие на МСК, выделенных из подкожного жира живота (7 доноров). С другой, он подавляет остеогенную дифференцировку в МСК жировой ткани надколенной области (6 доноров) и МСК надкостницы (3 донора). Сравнение уровня экспрессии генов-маркеров показало, что ПТГ усиливает дифференцировку МСК жировой клетчатки живота до значений, превышающих таковые в МСК надкостницы.

Для выяснения молекулярных механизмов разнонаправленного действия ПТГ на дифференцировку мы регистрировали ПТГ-зависимую кальциевую сигнализацию на уровне одиночных клеток. МСК разных организменных депо демонстрируют различный профиль  $Ca^{2+}$  сигналов в ответ на ПТГ. В наших экспериментах мы установили три типа ответов: 1) одиночное транзитное повышение внутриклеточного Са, зависящее от ИФЗ; 2) кальциевые осцилляции; 3) плавное цАМФ-зависимое повышение внутриклеточного Са. Доля клеток, отвечающих каждому из вариантов, коррелирует с направлением влияния ПТГ на дифференцировку: индуцируемые осцилляции – с подавлением, а цАМФ-зависимый прирост  $Ca^{2+}$  – с усилением дифференцировки. При помощи ингибиторного анализа мы показали, что сигнальные каскады конкурируют друг с другом за возможность активации рецептором. От исхода этой конкуренции зависит влияние ПТГ на остеогенную дифференцировку МСК.

Для оценки роли цАМФ-зависимого пути в остеогенной дифференцировке мы измерили уровень экспрессии мембранных изоформ

аденилатциклаз и обнаружили повышение экспрессии 1 и 7 изоформ при остеогенной дифференцировке МСК. При помощи системы редактирования генома CRISPR-Cas была получена клеточная линия, нокаутная по аденилатциклазе 1. Нокаут нарушил способность клеток к остеогенной дифференцировке, при этом экспрессия аденилатциклазы 7 осталась прежней. Также ПТГ не оказал влияния на остеогенную дифференцировку нокаутных клеток. Таким образом, мы показали, что аденилатциклаза 1 является не только важным звеном передачи сигнала при остеогенной дифференцировке, а также может опосредовать модулирующий эффект ПТГ.

Финансирование. Работы выполнены при поддержке фонда РФФ (грант № 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека»).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю., Маказан Н.В. и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. 2021. 76(5): 506-17.
2. Lupp A., Klenk C., Röcken C. et al. // Eur. J. Endocrinol. 2010. 162(5): 979-86.
3. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Sozaeva L. et al. // Cells. 2022. 11(21): 3519.
4. Selvamurugan N., Chou W.Y., Pearman A.T. et al. // J. Biol. Chem. 1998. 273(17): 10647-57.
5. Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F. et al. // Nature. 2010. 466(7308): 829-34.
6. Park J.H., Lee N.K., Lee S.Y. // Molecules and cells. 2017. 40(10): 706-13.
7. Prisby R., Guignandon A., Vanden-Bossche A. et al. // J. Bone Miner. Res. 2011. 26(11): 2583-96.

## СЕНСИТИЗАЦИЯ ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК К НОРАДРЕНАЛИНУ – КЛЮЧЕВОЙ ЭТАП РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОЖИРЕНИЕМ

*Чечехин В.И., Иванова А.М., Кулебякин К.Ю.,  
Калинина Н.И., Тюрин-Кузьмин П.А.*

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Ожирение является одним из наиболее распространенных и социально значимых заболеваний в мире. Оно является причиной развития ряда заболеваний и патологических состояний, сокращающих продолжительность и ухудшающих качество жизни, например инфаркта миокарда, дислипидемии и сахарного

диабета [1]. Артериальная гипертензия является одним из наиболее распространенных осложнений развития ожирения. При этом порядка 70% случаев первичной артериальной гипертензии связывают с развитием ожирения [2]. Одним из основных механизмов развития артериальной гипертензии при ожирении является повышение общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС). Повышение ОПСС в свою очередь связано с нарушением баланса действия вазоконстрикторов и вазодилататоров на сосуды. При ожирении происходит повышение количества ангиотензина II, норадреналина, являющихся основными вазоконстрикторами. Повышение ангиотензина II и норадреналина во многом опосредовано развитием гиперактивации симпатической нервной системы (СНС), поскольку активность ренин-ангиотензиновой системы напрямую зависит от стимуляции почек окончаниями СНС [3]. То есть основным механизмом развития артериальной гипертензии при ожирении является гиперактивация СНС. Причем гиперактивация СНС является следствием развития ожирения у 95-100% пациентов [4]. Однако, несмотря на это, у части пациентов с ожирением артериальная гипертензия не развивается. Следовательно, можно предположить, что на уровне клеток сосудов имеются различия между пациентами с ожирением, у которых развивается артериальная гипертензия и пациентами с ожирением и нормальным давлением. В данном исследовании мы выяснили механизмы, опосредующие действие симпатической нервной системы на клетки, составляющие сосудистую стенку.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) располагаются периваскулярно и являются ключевыми регуляторами функций жировой ткани и, вероятно, ее сосудов. Перicytes, входящие в состав сосуда, также являются частью популяции МСК. Они осуществляют секрецию множества паракринных факторов и регулируют ангиогенез и нейрогенез. Также МСК могут дифференцироваться в адипоциты, хондробласты и остеобласты. Основными маркерами МСК являются CD73, CD105, CD90, NG2, PDGFR $\beta$  [5]. Данные клетки подвергаются строгой нейрогуморальной регуляции. При этом для этих клеток характерны уникальные механизмы регуляции их функций [6,7]. Так, паратиреоидный гормон (ПТГ) может вызывать 3 типа кальциевых ответов в МСК: одиночные всплески кальция, кальциевые осцилляции и медленный подъем уровня кальция. Медленные подъемы кальция зависят от цАМФ и ассоциированы с проостеогенным эффектом ПТГ. В то же время кальциевые осцилляции в ответ на ПТГ зависят от активности фосфолипазы Ц и имеют антиостеогенный эффект на МСК [8].

**Материалы и методы.** Иммунофлуоресцентную окраску срезов жировой ткани осуществляли путем фиксирования в пара-формальдегиде с последующей последовательной инкубацией в первичных и вторичных антителах. Использовали первичные антитела к  $\alpha 1A$ - (ab137123, Abcam,

1:250),  $\alpha$ 1B- (ab169523, Abcam, 1:100),  $\alpha$ 1D-адренорецепторам (sc-390884, Santa Cruz, 1:100), CD31 (IR610, Dako) и  $\alpha$ -SMA (M0851, Dako). Изображения были получены с использованием конфокального микроскопа LSM 780, программного обеспечения ZEN2010 (Zeiss) и ImageJ (NIH) [9].

Выделение первичной культуры МСК осуществляли путем ферментативного расщепления жировой ткани с помощью смеси коллагеназы и диспазы в течение 1 часа. Далее клетки культивировали в AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащей 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone) и 1% раствор антибиотиков и антимикотика. Клетки пересаживали с использованием растворов трипсина и Версена [10].

Анализ чувствительности МСК к норадреналину на уровне одиночных клеток осуществляли с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, как нами было описано ранее [11,12]. Клетки высаживали на 48-лучночные планшеты в плотности 5-10% от монослоя. Перед экспериментом клетки окрашивали флуоресцентным красителем Fluo-8, чувствительным к уровню внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Для регистрации кальциевых ответов на добавление норадреналина клетки снимали с интервалом 30 секунд. Гормон добавляли во время съемки фильма прямо под микроскопом и далее снимали в течение 10-15 минут. Для исследования изменения чувствительности к катехоламинам клетки преинкубировали с норадреналином 1 мкМ в течение 1 часа за 6, 12, 24 часа до эксперимента. Определяемым показателем служило изменение доли отвечающих на норадреналин клеток по сравнению с контролем.

Анализ транскриптома одиночных клеток осуществляли на МСК первого пассажа с помощью коммерчески доступных китов 10x Genomics второй версии с использованием Chromium Controller (10x Genomics). Подготовку библиотек и секвенирование проводили с целью получить 8 тысяч клеток на образец. Биоинформатический анализ осуществляли с использованием CellRanger 6.1.2, Seurat 4.0.4 и SCENIC [13-15].

Контракцию МСК-коллагеновых дисков осуществляли по протоколу, описанному ранее с использованием коллагена и ДМЕМ с низким содержанием глюкозы [16]. Площадь МСК-коллагеновых дисков измеряли с помощью микроскопа Nikon SMZ18.

Подготовку образцов для вестерн-блоттинга проводили с помощью SDS буфера с дальнейшим измерением концентрации белка методом Брэдфорда. Вестерн-блоттинг осуществляли с использованием антител, примененных для иммунофлуоресцентного анализа. Детекцию белковых полос осуществляли с помощью ChemiDoc Imaging System (BioRad).

**Результаты.** Вазоконстрикторное действие норадреналин оказывает за счет активации  $\alpha$ 1-адренорецепторов. В связи с этим мы



проанализировали распределение всех изоформ  $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани пациентов с ожирением с нормальным артериальным давлением и пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии. Мы выяснили, что в сосудах жировой ткани основным является  $\alpha 1A$ -адренорецептор, изоформы  $\alpha 1B$  и  $\alpha 1D$  представлены значительно реже. При этом у пациентов с ожирением и нормальным артериальным давлением  $\alpha 1A$ -адренорецепторы располагаются не на эндотелиальных и гладкомышечных клетках, а на PDGFR $\beta$ + мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (МСК). Однако у пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии,  $\alpha 1A$ -адренорецепторы располагаются не только на PDGFR $\beta$ +МСК, но и частично на клетках, экспрессирующих  $\alpha$ -гладкомышечный актин. Кроме того, доля периваскулярных клеток, экспрессирующих  $\alpha 1A$ -адренорецепторы у пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии, была выше, чем у пациентов с ожирением и нормальным давлением. Таким образом, норадреналин при действии на сосуды пациентов с ожирением и артериальной гипертензией, вероятно, действует на большее количество клеток.

Мы предположили, что наблюдаемые изменения в распределении  $\alpha 1A$ -адренорецепторов являются следствием развития гиперактивации симпатической нервной системы. Для того чтобы выяснить каким образом развитие гиперактивации симпатической нервной системы влияет на экспрессию и функциональность  $\alpha 1A$ -адренорецепторов мы выделили МСК из жировой ткани человека. Путем часового воздействия на клетки норадреналином мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы и через 3, 6, 12 и 24 часа оценивали уровень экспрессии  $\alpha 1A$ -адренорецепторов на уровне белка. Мы показали, что при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы происходит увеличение экспрессии  $\alpha 1A$ -адренорецепторов через 6 часов, а через 24 часа уровень белка адренергического рецептора возвращается к базальному [12,17]. Для того чтобы проверить функциональность  $\alpha 1A$ -адренорецепторов, мы проанализировали количество клеток, отвечающих на стимуляцию норадреналином повышением уровня внутриклеточного кальция. Мы выяснили, что через 6 часов после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы повышается доля клеток, отвечающих на норадреналин кальциевой сигнализацией. Через 24 часа количество клеток, отвечающих на норадреналин, возвращается к базальному уровню. Следовательно, при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы происходит транзиторное повышение количества клеток, отвечающих на норадреналин кальциевой сигнализацией, что опосредовано повышением экспрессии  $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Однако данный феномен возникает не у всех доноров МСК. МСК пациентов с

ожирением и артериальной гипертензией способны к повышению количества клеток, отвечающих на норадреналин кальцием, а клетки пациентов с ожирением и нормальным давлением не способны [18].

Для того чтобы проанализировать влияние стимуляции норадреналином  $\alpha 1A$ -адренорецепторов, уровень которых был повышен при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы, мы провели анализ транскриптома одиночных клеток. Мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы и через 6 часов воздействовали на клетки норадреналином, далее через 12 часов анализировали транскриптом одиночных клеток. Используя данный метод, мы показали, что после последовательного воздействия норадреналина на МСК, происходит усиление контрактильности клеток. Повышается количество клеток, экспрессирующих на высоком уровне *ACTA2*, *MYL9*, *MYLK* и другие гены, связанные с сократительной функцией. Помимо этого, повышается активность транскрипционных факторов, связанных с контрактильностью во всех клетках популяции МСК. Вероятно, при действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходит переключение всей популяции МСК на контрактильный фенотип. Чтобы проанализировать сократительную функцию МСК после воздействия норадреналином, мы провели функциональный тест на модели МСК-коллагеновых дисков. Используя данную модель, мы показали, что только последовательное воздействие норадреналином с интервалом в 6 часов приводит к повышению контрактильности клеток. Простая стимуляция норадреналином вне зависимости от времени нанесения гормона не усиливает контрактильность клеток по сравнению с контролем.

Таким образом, мы показали, что повышение контрактильности МСК, опосредовано повышением экспрессии функциональных  $\alpha 1A$ -адренорецепторов при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. На основании полученных результатов можно предположить следующий механизм развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Ожирение приводит к гиперактивации симпатической нервной системы (СНС). Гиперактивация СНС приводит к повышению экспрессии  $\alpha 1A$ -адренорецепторов на периваскулярных МСК. При повторном воздействии на МСК норадреналином происходит переключение клеток на контрактильный фенотип. Переключение фенотипа клеток, вероятно, приводит к возникновению *in vivo* клеток, созэкспрессирующих  $\alpha 1A$ -адренорецепторы и  $\alpha$ -гладкомышечный актин. Повышение контрактильности клеток приводит к усилению вазоконстрикции и как следствие к росту артериального давления и развитию гипертензии. При этом у части пациентов с ожирением не происходит повышения

экспрессии  $\alpha 1A$ -адренорецепторов в ответ на гиперактивацию симпатической нервной системы. В связи с этим у данных пациентов не происходит развитие ожирения.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке РФФ в рамках проекта № 21-15-00311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Psaty B.M. et al.* // Archives of Internal Medicine. 2001. 161(9): 1183-92.
2. *Must A. et al.* // 1999. 282(16): 1523-9.
3. *Kotchen T.A.* // American Journal of Hypertension. 2010. 23: 1170-8.
4. *Kalil G.Z., Haynes W.G.* // Hypertension Research. 2012. 35(1): 4-16.
5. *Kalinina N. et al.* // Stem Cell Research and Therapy. 2015. 6(1): 1-12.
6. *Chechekhin V. et al.* // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. 10: 1-11.
7. *Чечехин В.И., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.* // Онтогенез. 2022. 53(3): 163-72.
8. *Kulebyakin K. et al.* // Cells. 2022. 11(21): 1-16.
9. *Schindelin J. et al.* // Nature methods. 2012. 9(7): 676-82.
10. *Mushahary D. et al.* // Cytometry Part A. 2018. 93(1): 19-31.
11. *Tyurin-Kuzmin P. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. 19(12).
12. *Tyurin-Kuzmin P.A. et al.* // Scientific Reports. 2016. 6: 1-9.
13. *Aibar S. et al.* // Nature Methods. 2018. 14(11): 1083-6.
14. *Hao Y. et al.* // Cell. 2021. 183: 3573-87.
15. *Хозяинова А.А. и др.* // Биохимия. 2023. (88)2. 171-98.
16. *Kaiser D.* Cell-Cell interactions / D. Kaiser, Ed. S.P. Colgan, Humana Press, 2006. 103-9 p.
17. *Tyurin-Kuzmin P.A. et al.* // Scientific Data. 2018. 5: 1-8.
18. *Chechekhin V. et al.* // Cells. 2023. 585(12): 1-14.

\*\*\*

## СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ И НЕЙРОНАХ

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МИОКАРДЕ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКРОТАЛИНА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ IGF-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Адашева Д.А.<sup>1</sup>, Артемьева М.М.<sup>2</sup>, Иванова А.Д.<sup>3</sup>, Медведева Н.А.<sup>2</sup>, Катруха А.Г.<sup>1</sup>, Серебряная Д.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии, биологический факультет  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

**Введение.** Гипертрофия миокарда – это увеличение толщины сердечной стенки, которое происходит в ответ на биомеханический стресс и/или недостаточное кровоснабжение. Гипертрофические изменения могут развиваться вследствие интенсивных занятий спортом (физиологическая гипертрофия), а также при развитии различных сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), например, таких, как сердечная недостаточность, артериальная гипертензия, различные виды врожденных и приобретенных пороков сердца, а также ишемическая болезнь сердца (патологическая гипертрофия). Патологическая гипертрофия сопровождается повышенной экспрессией натрийуретических пептидов ANP и BNP, а также снижением уровня экспрессии  $\alpha$ -изоформы тяжёлой цепи миозина ( $\alpha$ -МНС) с одновременным увеличением экспрессии  $\beta$ -изоформы тяжёлой цепи миозина ( $\beta$ -МНС). Длительная патологическая гипертрофия миокарда в большинстве случаев ведёт к летальному исходу [1]. Несмотря на важность поиска терапевтических агентов для лечения сопровождающихся гипертрофией ССЗ и потенциальных мишеней их воздействия, молекулярные механизмы развития патологической гипертрофии остаются изученными не до конца, в связи с чем исследование данного патологического состояния представляет собой актуальную задачу.

Среди современных подходов, используемых для моделирования гипертрофии в сердечной ткани, наиболее перспективным и приближенным к реальным физиологическим условиям является развитие гипертрофии на моделях животных *in vivo*. Общий принцип

моделирования гипертрофии в этом случае заключается в создании таких стрессовых условий, как, например, гипоксия и лекарственные воздействия, при которых у экспериментальных животных нарушается работа сердечно-сосудистой системы и возникает потребность в компенсации функции миокарда.

Результаты последних исследований указывают на то, что в патогенез некоторых сердечно-сосудистых заболеваний вовлечена система белков, регулирующих биодоступность IGF [2]. Основным регулятором биодоступности IGF – металлопротеаза PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) – является маркером острого коронарного синдрома: он был обнаружен в нестабильных атеросклеротических бляшках на стенках кровеносных сосудов [3]. Conover и соавторами было показано, что при повышенной экспрессии PAPP-A в гладкомышечной ткани артерий происходит ускорение развития атеросклеротического поражения сосудов, то есть PAPP-A является атерогенным фактором. PAPP-A является единственной известной на сегодняшний день протеазой, которая расщепляет белок IGFBP-4 (Insulin Growth Factor Binding Protein-4) по специфическому сайту с образованием двух фрагментов N-концевого (NT-IGFBP-4) и C-концевого (CT-IGFBP-4). В ряде исследований было показано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 (NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4) ассоциирован с увеличением риска возникновения ОКС у пациентов с ИБС и наступлением смерти от ССЗ у больных диабетом 1 типа [4,5]. Недавно было обнаружено, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 в крови у больных сердечной недостаточностью (CH) – состоянием, которое может развиваться вследствие ОКС и инфаркта миокарда – также ассоциирован с повышенным риском летального исхода [6,7]. И, наконец, в нашей лаборатории было показано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 наблюдается при моделировании гипертрофических изменений на первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы с использованием эндотелина-1 [8].

Как уже упоминалось ранее, наиболее приближенной к реальным физиологическим условиям моделью развития гипертрофии является *in vivo* модель. В этой связи, целью настоящей работы являлось развитие гипертрофии у крыс с использованием кроталина для дальнейших исследований роли IGF-системы и ее компонентов в развитии ССЗ.

**Материалы и методы. Индукция гипертрофии сердца под действием монокроталина.** Крыс линии Wistar случайным образом распределяли в контрольную группу и группу, получавшую монокроталин (МКТ). Рассчитывали количество МКТ для инъекции животным из расчета 60 мг/кг. МКТ, приготовленный на 60% спирте в дозе 20 мг/мл

вводили крысам подкожно в вентральную часть грудной клетки, контрольной группе вводили аналогичную дозу 60% спирта. После чего содержали крыс в виварии в течение месяца.

**Выделение первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс.** После месяца содержания крыс в виварии, как контрольной, так и МКТ-группы, выделяли первичную культуру кардиомиоцитов по протоколу Alam и соавторов с небольшими изменениями [9].

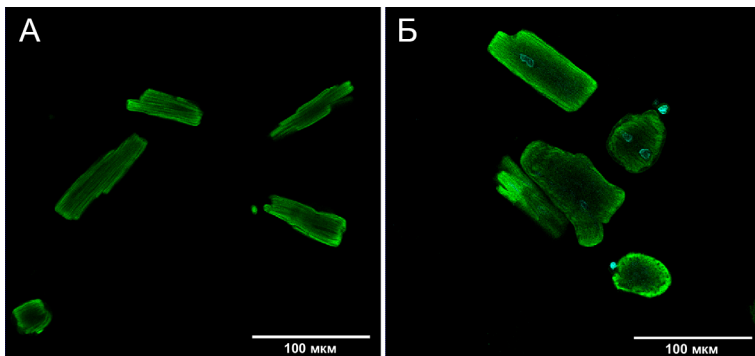
**Иммуноцитохимическое окрашивание культуры кардиомиоцитов.** Для характеристики кардиомиоцитов в полученной культуре проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 для детекции актина, а также ядерным интеркалирующим красителем DAPI.

Культуру кардиомиоцитов промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) от компонентов среды, после чего проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембран клеток ФСБ в присутствии 4% параформальдегида и 0.1% Тритона X-100, соответственно. Затем в лунки планшета вносили 1% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) в ФСБТ (ФСБ, 0.5% Tween 20, pH 7.4). Затем добавляли фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентной меткой Alexa-488, в указанных производителем разведениях на блокировочном буфере ФСБТ, содержащем 1% ЭТС. Инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. После отмывки добавляли специфический краситель хроматина DAPI, приготовленный на ФСБ, в указанном производителем разведении. Полученные препараты визуализировали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа Olympus FV-300.

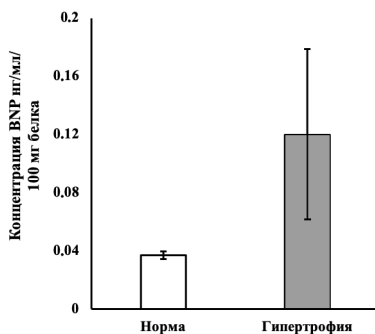
**Измерение концентрации натрийуретического пептида В (BNP).** Концентрацию BNP определяли методом флуориммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пары антител 24C5-AbBNP2Eu<sup>3+</sup> по протоколу DELFIA, как описано [8].

В качестве «нижних» антител были использованы моноклональные антитела 24C5, а в качестве детекторных антител – моноклональные антитела AbBNP2Eu<sup>3+</sup>. Полученные результаты нормировали на 100 мг клеточного лизата.

**Результаты и их обсуждение.** Для моделирования гипертрофии нами была выбрана модель создания легочной гипертензии, индуцированная монокроталином (МКТ). МКТ при попадании внутрь организма, способствует развитию легочной гипертензии и гипертрофии правого желудочка. После развития гипертрофии мы выделяли кардиомиоциты из контрольных и гипертрофированных сердец, как описано в «Методах исследования». Результаты представлены на рис. 1А и Б.



**Рис. 1.** Иммунофлуоресцентное окрашивание полученных культур с использованием: флуоресцентного ядерного красителя DAPI и фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488. А – Кардиомиоциты, выделенные из крысы контрольной группы. Б – Кардиомиоциты, выделенные из крысы МКТ-группы.



**Рис. 2.** Концентрация BNP в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов, выделенных из крыс контрольной и гипертрофированной группы (МКТ-группы)  $n = 5$ , \*  $p < 0.05$ .

Как видно из результатов, кардиомиоциты, полученные из контрольных сердец, имеют четко выраженную цилиндрическую форму, тогда как кардиомиоциты, полученные из гипертрофированных сердец, более округлые. Также видно, что кардиомиоциты, полученные из гипертрофированных сердец имеют более крупные размеры. Следует отметить, что оба вида полученных кардиомиоцитов демонстрировали способность к сокращению (данные не представлены). Также в обоих типах культур наблюдается поперечная исчерченность, что говорит о зрелости сократительных структур в полученных кардиомиоцитах. Для

подтверждения гипертрофического фенотипа в культуральной среде кардиомиоцитов контрольных и гипертрофированных крыс мы определяли концентрацию натрийуретического пептида В-типа, являющегося маркером гипертрофии (см. рис. 2).

Как видно из представленных данных, концентрация BNP в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов в 3 раза выше по сравнению с кардиомиоцитами, полученными из контрольных животных, что говорит о развитии гипертрофии под действием монокроталина. Таким образом, данную модель можно использовать для исследования молекулярных механизмов развития гипертрофии и, в частности, для исследования роли IGF-системы и ее компонентов в патогенезе различных ССЗ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Frey N., Olson E.N. // Annu. Rev. Physiol. 2003. 65: 45-79.
2. Annunziata M., Granata R., Ghigo E. // Acta Diabetol. 2011. 48(1): 1-9.
3. Bayes-Genis A., Conover C.A., Overgaard M.T. et al. // N. Engl. J. Med. 2001. 345(14): 1022-9.
4. Postnikov A.B., Smolyanova T.I., Kharitonov A.V. et al. // Clin. Biochem. 2012. 45(7-8): 519-24.
5. Konev A.A., Smolyanova T.I., Kharitonov A.V. et al. // Clin. Biochem. 2015. 48(12): 774-80.
6. Konev A.A., Serebryanaya D.V., Koshkina E.V. et al. // Clin. Biochem. 2018. 55: 56-62.
7. Konev A.A., Kharitonov A.V., Rozov F.N. et al. // ESC Heart Fail. 2020. 7(2): 434-44.
8. Serebryanaya D.V., Adasheva D.A., Konev A.A. et al. // Biochemistry (Mosc). 2021. 86(11): 1395-406.
9. Alam P., Maliken B.D., Ivey M.J. et al. // J. Vis. Exp. 2020. (164): 10.3791/61073.

## МАРКЕРЫ КАТАБОЛИЧЕСКИХ И АНАБОЛИЧЕСКИХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ 21-СУТОЧНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

*Белова С.П., Зарипова К.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.*

ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

**Введение.** Снижение или полное прекращение сократительной активности скелетных мышц приводит к снижению их веса, площади поперечного сечения, максимальной силы и скорости сокращения, а также снижению работоспособности. К атрофии мышц приводит иммобилизация конечностей, гравитационная разгрузка или постельный режим, которым сопровождаются различные патологические состояния.



Антиортостатическая гипокинезия (АНОГ) является одной из моделей, с помощью которой воспроизводится механическая и функциональная разгрузка скелетных мышц. Принято считать, что атрофия является результатом сигнальных и молекулярных изменений двух процессов – синтеза белка и распада белка [1,2]. Однако, соотношение вклада этих процессов в разных моделях разгрузки и на разных мышцах и объектах исследования давно является предметом дискуссий [3,4]. Целью нашего исследования является анализ маркеров катаболических и анаболических сигнальных путей в постуральной (*m. soleus*) и локомоторной (*m. vastus lateralis*) мышцах человека при 21-суточной антиортостатической гипокинезии. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25-35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона  $-6^\circ$ . Игольчатая биопсия *m. soleus* и *m. vastus lateralis* проводилась по методу Бергстрема до гипокинезии и на 21 сутки гипокинезии.

**Результаты.** Функциональная разгрузка скелетных мышц приводит к усилению протеасомной деградации, и ключевую роль в этом процессе выполняют мышечно-специфические E3-лигазы атрогин-1/MAFbx и MuRF-1. Экспрессия MuRF-1 после 21-суточной гипокинезии увеличивалась на 42% в *m. soleus*, но не изменялась в *m. vastus lateralis*. Экспрессия MAFbx увеличивалась и в *m. soleus* и в *m. vastus lateralis* на 67 и 47% соответственно.

После АНОГ в *m. soleus* наблюдалось снижение на 59% уровня фосфорилирования FoxO3, важного транскрипционного фактора, регулирующего экспрессию E3-убиквитинлигаз. Уровень фосфорилирования Akt, которая определяет активность FOXO3, был на 44% также снижен. При этом в *m. vastus lateralis* не наблюдалось достоверных изменений в уровне фосфорилирования FoxO3 и Akt. Экспрессия миогенина, транскрипционного фактора, также регулирующего активность E3-убиквитинлигаз, была увеличена после 21-суточной гипокинезии и в *m. soleus* и *m. vastus lateralis* на 50 и 37% соответственно.

Анализ анаболических маркеров показал достоверное снижение содержания IRS-1 на 17%, фосфорилирования P90RSK1 на 18% только в *m. soleus*. Фосфорилирование 4EBP1 снижалось в обеих мышцах – на 18% в *m. vastus lateralis*, на 25% в *m. soleus*. Фосфорилирование GSK3b не менялось ни в одной из мышц.

Фосфорилирование eEF2 (Eukaryotic elongation factor 2), которое приводит к снижению скорости элонгации трансляции, выросло на 69% в *m. vastus lateralis*, и на 275 в *m. soleus*. Фосфорилирование AMPK снижалось в обеих мышцах – на 23% в *m. vastus lateralis*, на 21% в *m. soleus*.

**Выводы.** При 21-суточной гипокинезии и в *m. soleus* и в *m. vastus lateralis* наблюдается увеличение экспрессии E3-убиквитинлигазы MAFbx и регулирующего ее миогенина. Увеличение экспрессии MuRF-1 и транскрипционная активация FoxO3 наблюдаются только в *m. soleus*.

Некоторые маркеры анаболического сигналинга были изменены в обеих мышцах – 4EBP1, AMPK, eEF2. IRS-1 и P90RSK1 изменялся только в *m. soleus*. Совокупность данных подтверждает, что при гипокинезии в постуральной *m. soleus* происходят более глубокие атрофические изменения в снижении синтеза белка и усилении его распада.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-75-00065.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jackman R.W., Kandarian S.C. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. 287: C834-43.
2. Bodine S.C. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2013. 45: 2200-8.
3. Phillips S.M., McGlory C. // J. Physiol. 2014. 592: 5341-3.
4. Reid M.B., Judge A.R., Bodine S.C. // J. Physiol. 2014. 592: 5345-7.

## ПОИСК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ГЕННОГО ОТВЕТА НА 6-СУТОЧНУЮ «СУХУЮ» ИММЕРСИЮ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА

Борзых А.А.<sup>1</sup>, Махновский П.А.<sup>1</sup>, Венхвадзе Т.Ф.<sup>1,2</sup>, Леднев Е.М.<sup>1</sup>,  
Орлов О.И.<sup>1</sup>, Томиловская Е.С.<sup>1</sup>, Попов Д.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Физиологические эффекты гипокинезии (особенно, при «сухой» иммерсии и космическом полете) более выражены для *m. soleus* – мышцы, состоящей преимущественно из медленных мышечных волокон I типа – чем для других мышц ног [1]. Это связано с выраженным рефлекторным падением тонуса *m. soleus* в ответ на снижение опорной афферентации [2]. Более выраженное падение тонуса в *m. soleus*, чем в других мышцах, может привести к большим изменениям в клеточной сигнализации и генной экспрессии. Примеры таких изменений продемонстрированы для отдельных сигнальных молекул или генов в работах, преимущественно выполненных на мышцах грызунов [3]. Широкозахватные методы анализа генной экспрессии показали, что у человека после 60-суточной постельной гипокинезии [4] и у мышей после месячного космического полета [1] изменения транскриптома в *m. soleus* более выражены, чем в других мышцах. Однако остается неясным насколько рано проявляются эти различия и за счет каких механизмов они регулируются. В ряде работ изучалось влияние различных моделей

снижения двигательной активности на транскриптом скелетной мышцы человека (в основном, *m. vastus lateralis*), что позволило выявить ключевые транскриптомные ответы [5-7]. Однако, транскрипционные факторы, регулирующие эти изменения, во многом остаются неизученными. Целью нашего исследования было 1) сопоставить изменения транскриптомного профиля *m. soleus* и *m. vastus lateralis* после 6-суточной «сухой» иммерсии (СИ), 2) предсказать транскрипционные факторы, ответственные за различия в экспрессии множества генов в разных мышцах в базальном состоянии и после СИ.

**Материалы и методы.** Программа исследования одобрена Комитетом по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 594 от 06.09.2021). Все добровольцы давали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Десять здоровых мужчин (25-35 лет) в течение 7 суток находились в «сухой» иммерсии. Биопсические пробы брали из *m. soleus* и *m. vastus lateralis* под местной анестезией (2% лидокаин) через 3 ч после стандартизированного легкого завтрака за 12 дней до и через 6 суток после СИ.

**Секвенирование РНК и анализ данных.** Цепь-специфические библиотеки (NEBNext Ultra II RNA, NEB) секвенировали на анализаторе NextSeq 550 (Illumina, США) (75 п.н., ~60 млн прочтений/образец). Гены, изменившие экспрессию, определяли методом DESeq2 при  $P_{adj} < 0.01$  и  $|\text{изменении экспрессии}| \geq 1.25$ . Анализ функционального обогащения для биологических процессов и клеточных компонентов (UNIPROT KW BP/CC) проводили используя DAVID 6.8 ( $P_{adj} < 0.05$ ).

**Предсказание транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением транскриптома.** Мотивы связывания транскрипционных факторов искали в индивидуальном для каждого гена промоторном регионе – открытый хроматин скелетной мышцы человека вокруг старта инициации транскрипции, определённого в нашем предыдущем исследовании [8], с помощью метода позиционных весовых матриц (платформа GeneXplain и база данных TRANSFAC v2021.3 [9,10]), как было описано нами ранее [8].

**Результаты и обсуждение.** До СИ в *m. soleus*, состоящей преимущественно из медленных мышечных волокон, по сравнению со смешанной *m. vastus lateralis*, была понижена экспрессия 1326 мРНК, кодирующих регуляторы трансляции, ферменты гликолиза, белки трансмембранного транспорта и сократительные белки. Экспрессия генов, кодирующих регуляторы аэробного метаболизма, ферменты дыхания и  $\beta$ -окисления и регуляторы ангиогенеза, напротив, была повышена (1133 мРНК). Полученные данные согласуются с данными литературы о различиях в экспрессии мРНК и их белковых продуктов между мышцами с преимущественным содержанием волокон I или II типов.

СИ привела к более выраженному изменению транскриптома в *m. soleus* по сравнению с *m. vastus lateralis*. В *m. soleus* 562 мРНК увеличили и 996 мРНК снизили экспрессию, в *m. vastus lateralis* 208 мРНК увеличили и 392 мРНК снизили экспрессию. При этом, нескольких сотен генов являются общими для обеих мышц (увеличение – 112 мРНК, уменьшение – 293 мРНК), а остальные – уникальными. Эти данные согласуются с тем, что некоторые физиологические эффекты короткой и длительной гипокинезии более выражены для *m. soleus*, чем для других мышц ног [2]. Наличие уникальных наборов генов, изменивших экспрессию, свидетельствует о наличии специфических механизмов адаптации к снижению двигательной активности у разных мышц.

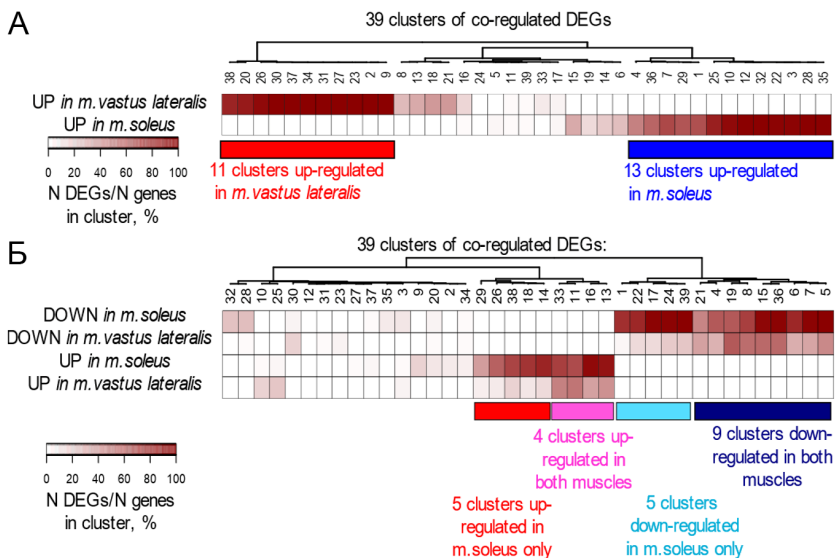
Анализ функционального обогащения показал, что общие для обеих мышц гены со сниженной экспрессией ассоциированы с митохондриальными белками (в том числе белками внутренней мембраны митохондрий), с регуляторами метаболизма жиров и мембранными белками (транспортёры ионов, различные каналы и переносчики). Уникальные гены, увеличившие свою экспрессию в *m. vastus lateralis*, в основном кодируют белки, локализованные в ядре (54 мРНК, транскрипционные регуляторы и т.п.), тогда как в *m. soleus*, уникальные гены с повышенной экспрессией, ассоциированы с белками клеточной мембраны (89 мРНК) и регуляторами иммунного ответа (25 мРНК).

Для уникальных генов, снизивших экспрессию в разных мышцах, также были выявлены различия в их функциях. В *m. vastus lateralis* такие гены, были ассоциированы с белками, секретлируемыми во внеклеточное пространство (18 генов) и белками микротрубочек (разные изоформы тубулина, 7 генов). Уникальные гены со сниженной экспрессией в *m. soleus* обогатили биологические процессы, ассоциированные с окислительным фосфорилированием и циклом Кребса (многочисленные белки внутренней и внешней мембраны митохондрии). Кроме того, эти гены были ассоциированы с метаболизмом жиров и ответом на клеточный стресс (белки теплового шока семейств HSP70, HSP90 и др. и белки MAPK-киназного каскада), а также с мембранными (белки цитоскелета и различные рецепторы) и секретлируемыми белками.

Мы выделили 39 кластеров ко-экспрессируемых (предположительно ко-регулируемых) генов, включающих от 19 до 147 мРНК. Затем кластеры со сходным паттерном экспрессии были объединены в подгруппы (рис. 1). Это позволило выделить кластеры с различным исходным уровнем экспрессии генов между *m. soleus* и *m. vastus lateralis* (13 кластеров, где *m. soleus* > *m. vastus lateralis* и 11 кластеров, где *m. vastus lateralis* > *m. soleus*; рис. 1А) и с изменениями в экспрессии генов в *m. soleus* и/или *m. vastus lateralis* после иммерсии (5 кластеров со снижением экспрессии только в *m. soleus*, 5 кластеров с

увеличением экспрессии только в *m. soleus*, 9 кластеров со снижением экспрессии в обеих мышцах, 4 кластера с увеличением экспрессии в обеих мышцах; рис. 1Б).

Нами, были охарактеризованы функции генов, входящих в каждый кластер и предсказаны 257 транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию этих генов. Так, нам удалось выделить отдельные группы генов, экспрессия которых в *m. soleus* отличалась от *m. vastus lateralis*. Среди транскрипционных факторов, предсказанных для этих групп коэкспрессируемых генов, были как хорошо известные регуляторы, так и регуляторы, функции которых до сих пор не ясны.



**Рис. 1.** Выделение подгрупп со сходными кластерами ко-экспрессируемых генов позволило выделить кластеры с различным исходным уровнем экспрессии генов между *m. soleus* и *m. vastus lateralis* (А) и с разным ответом этих мышц на СИ (Б).

Поиск транскрипционных факторов, регулирующих изменения экспрессии генов в разных мышцах после пребывания в СИ, показал, что в обеих мышцах присутствуют отдельные группы ко-регулируемых генов, тогда как уникальные группы были обнаружены только для *m. soleus*. Анализ промоторных регионов генов, входящих в эти группы, показал, что, например, снижение экспрессии генов митохондриальных белков и регуляторов метаболизма липидов в обеих мышцах (кластеры № 5, 7 и 36) ассоциировано, как с классическими регуляторами биогенеза митохондрий и жирового обмена – транскрипционные факторы семейства ESRRs, PPARs и RARs, так и с рядом других факторов NR2s, TAF1, SP4, ZBED1, ZBTB45, MEOX2.

Интересно отметить, что в уникальных для *m. soleus* группах увеличили экспрессию гены убиквитин-протеасомной системы и ряда мембранных и секретируемых белков, связанных с иммунным ответом (кластеры № 14 и 38).

**Заключение.** Используя разработанный нами ранее алгоритм [8], впервые был проведен поиск транскрипционных факторов в индивидуальных промоторных регионах ко-экспрессируемых генов в скелетных мышцах человека с разными функциональными возможностями до и после пребывания в «сухой» иммерсии. В результате было выявлено более двух сотен транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением экспрессии более двух тысяч ко-экспрессируемых генов, разделенных по группам (кластерам). Совпадение отдельных предсказанных нами транскрипционных факторов с описанными для них ранее генами-мишенями подтверждает корректность используемого нами подхода. Большое количество найденных нами кластер-специфичных транскрипционных факторов, чья роль в адаптации скелетной мышцы к гипокинезии неизвестна/малоизучена, открывают уникальную перспективу для целенаправленного исследования их функций в модельных исследованиях с подавлением/увеличением генной экспрессии на клетках и/или животных.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *da Silveira W.A., Fazelinia H., Rosenthal S.B. et al. // Cell. 2020. 183: 1185-1201.e20.*
2. *Kozlovskaya I.B., Sayenko I.V., Sayenko D.G. et al. // Acta. Astronaut. 2007. 60: 285-94.*
3. *Sharlo K., Tyganov S.A., Tomilovskaya E. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 23(1): 468.*
4. *Chopard A., Lecunff M., Danger R. et al. // Physiol. Genomics. 2009. 38(3): 291-302.*
5. *Pillon N.J., Gabriel B.M., Dollet L. et al. // Nat. Commun. 2020. 11(1): 470.*
6. *Deane C.S., Willis C.R.G., Phillips B.E. et al. // J. Cachexia Sarcopenia Muscle. 2021. 12(3): 629-45.*
7. *Makhnovskii P.A., Bokov R.O., Kolpakov F.A., Popov D.V. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(3): 1208.*
8. *Makhnovskii P.A., Gusev O.A., Bokov R.O. et al. // Hum. Genomics. 2022. 16(1): 24.*
9. *Wingender E. // Brief. Bioinform. 2008. 9(4): 326-32.*
10. *Koschmann J.A., Bhar P., Stegmaier A.E. // Microarrays (Basel). 2015. 4(2): 270-86.*

# ИССЛЕДОВАНИЕ PAPP-A-СПЕЦИФИЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА IGFBP-4 В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

*Гущеваров Д.А.<sup>1</sup>, Дя Г.А.<sup>1</sup>, Артемьева М.М.<sup>2</sup>, Владыченская Е.А.<sup>1</sup>,  
Медведева Н.А.<sup>2</sup>, Серебряная Д.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии, биологический факультет  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Поддержание жизнеспособности нейронов и астроцитов необходимо для правильного функционирования головного мозга в течение всего жизненного периода. Инсулиноподобные факторы роста, IGF1 и IGF2, играют важную роль в развитии и функционировании нервной системы, обеспечивая пролиферацию и жизнеспособность нейронов и астроцитов, входящих в ее состав. IGF1 и IGF2 действуют на клетки нервной ткани через взаимодействие со специфическими рецепторами IGF1R и IGF2R. В нервной ткани IGF1 и IGF2 преимущественно находятся в комплексе с IGF-связывающими белками (Insulin Growth Factor Binding Proteins, IGFbps). Биодоступность IGF для клеток регулируется путем протеолиза комплекса различных IGFBP с IGF под действием специфических протеаз [1]. Показано, что в нервной ткани IGF высвобождается в результате протеолиза белков IGFBP-2, IGFBP-3 и IGFBP-5 [2]. В нашей группе недавно было продемонстрировано, что специфическому протеолизу под действием протеазы PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) в нервной ткани также подвергается IGFBP-4 [2]. PAPP-A является матриксной металлопротеазой, большая её часть в крови циркулирует в форме гетеротетрамера, в состав которого входят димерный PAPP-A, состоящий из двух субъединиц и две субъединицы proMBP – предшественника основного белка эозинофилов, являющегося ингибитором протеазной активности PAPP-A. Димерная форма PAPP-A, в отличие от тетрамерной, обладает протеолитической активностью [3]. PAPP-A является единственной протеазой, расщепляющей IGFBP-4 в физиологических условиях. Протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A происходит по специфическому участку (между аминокислотными остатками Met135 и Lys136) и в результате расщепления образуются два протеолитических фрагмента: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-концевой (CT-IGFBP-4), соответственно [4].

С возрастом процессы нарушения функционирования нейронов и астроцитов в головном мозге интенсифицируются и может возрастать потребность в активации нейропротекторных механизмов. Таким образом,

целью нашей работы является исследование динамики RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в нервной ткани крыс разных возрастов.

**Методы исследования. Выделение первичной культуры нервной ткани.** Крысы разных возрастов (1-дневные, 7-дневные, 14-дневные, 18-дневные и 30-дневные) были любезно представлены сотрудником ФГБНУ научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии Н. Б. Константиновой. Все эксперименты проводили в соответствии с методическими рекомендациями этического комитета МГУ имени М.В. Ломоносова. Протокол выделения основан на оригинальной методике [Van Zeller et. al., 2023] с незначительными модификациями. После декапитации из крыс извлекали головной мозг и помещали его в 3 мл холодного калий-фосфатного буфера (ФСБ, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH 6.8), после чего добавляли 2 мл DMEM/F-12 (питательная среда F-12, Gibco, Великобритания), содержащая GlutaMAX, 10% ФБС (фетальная бычья сыворотка) и антибиотик гентамицин (40 мг/л). Далее мозг механически разрушали с использованием гомогенизатора Поттера стекло-стекло, после чего полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 5 минут при 300 g при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 5 мл среды DMEM/F-12 и повторно центрифугировали 5 минут при 300 g, после чего суспендирование и центрифугирование проводили еще раз в аналогичных условиях. Далее по 50 мкл полученной клеточной суспензии вносили в 12-луночные культуральные планшеты, содержащие по 1.5 мл среды DMEM/F-12/луночка, которые предварительно инкубировали в течение 30 минут с 0.1% поли-Д-лизином при +37°C. Клеточные культуры растили в инкубаторе при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$  в течение нескольких дней до образования на них монослоя клеток, смену среды проводили каждые 2 дня.

**Протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры нервной ткани.** Для проведения протеолитической деградции IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры клеток головного мозга крысы готовили 10-кратную субстратную смесь, состоящую из рекомбинантного IGFBP-4 человека (3 мкг/мл), рекомбинантного IGF-2 человека (0.85 мкг/мл) и 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , на ТСБ (20 mM Трис- $\text{HCl}$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.4). Для образования комплекса IGFBP-4/IGF-2 субстратную смесь инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. В лунки культуральных планшетов с первичными культурами вносили по 1080 мкл культуральной среды DMEM/F-12 и 120 мкл субстратной смеси, после чего инкубировали культуральные планшеты при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Через различные промежутки времени (0 ч, 3 ч и 24 ч) отбирали 400 мкл кондиционированной среды из лунок с клеточными культурами и останавливали протеолитическую реакцию добавлением ЭДТА до



конечной концентрации 5 мМ. Полученные пробы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для проведения протеолитического расщепления IGFBP-4 в отсутствие IGF-2 эксперимент проводили аналогичным образом, используя субстратную смесь, не содержащую IGF-2. В случае эксперимента с ингибированием протеолитической активности RAPP-A в кондиционированную среду к клеткам добавляли ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ, инкубировали 5 минут, далее в среде проводили протеолитическое расщепление IGFBP-4, как описано ранее.

**Приготовление клеточных лизатов.** Клетки, в кондиционированной среде которых проводили протеолитическое расщепление IGFBP-4, промывали 3 раза ФСБ и лизировали в 500 мкл лизис-буфера (0.1% Тритон X-100, ФМСФ 17 мкг/мл, апротинин 3 мкг/мл, пепстатин 1 мкМ на ФСБ). Клеточные мембраны разрушали обработкой ультразвуком в течение 3 секунд, используя ультразвуковой дезинтегратор (Branson Sonifier, США). Полученные пробы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

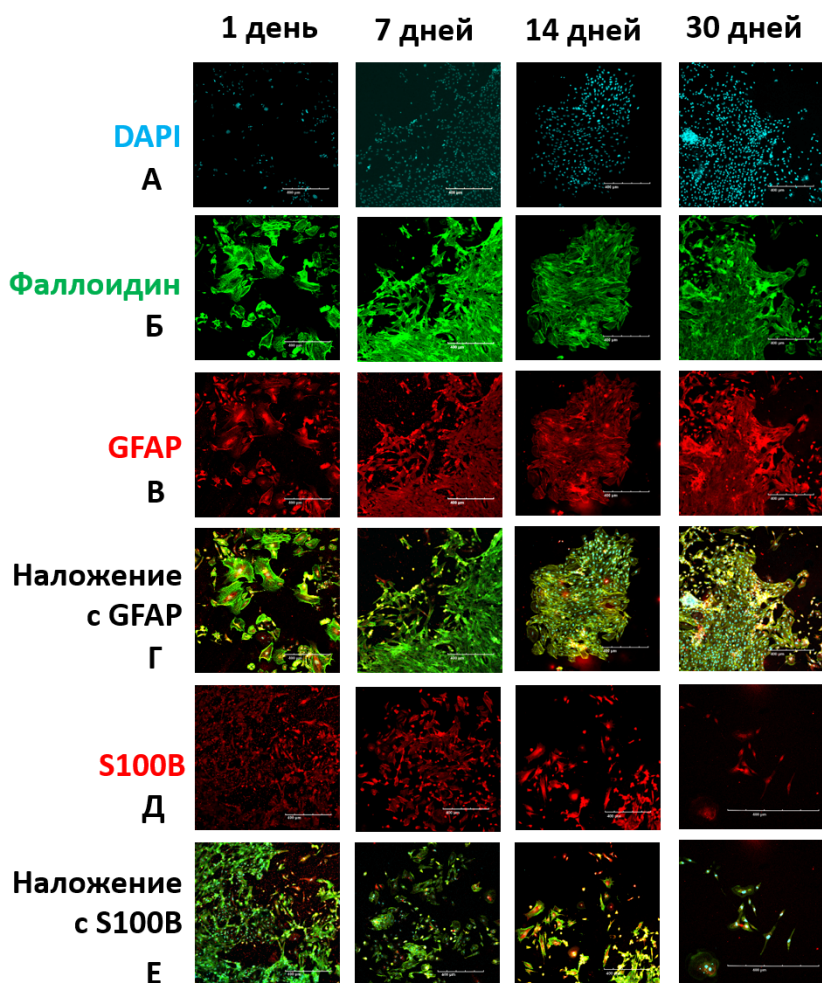
**Одностадийный флуориммунный анализ (ФИА) «сэндвич»-типа.** Для детекции NT-IGFBP-4 использовали одностадийную иммунохимическую систему «сэндвич»-типа, распознающую неоэпитоп, образующийся в результате RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. В качестве нижних антител использовали моноклональные антитела IBP3, специфичные к неоэпиту NT-IGFBP-4. В качестве детекторных антител использовали моноклональные антитела IBP180, конъюгированные со стабильным хелатом ионов европия  $\text{Eu}^{3+}$ .

В лунки вносили 100 мкл нижних антител приготовленных на ФСБ до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали планшеты в течение 40 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Промывали лунки 2 раза промывочным раствором (10 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 0.025% Tween 20, pH 7.8). Далее в лунки добавляли по 75 мкл антигена (исследуемые пробы или стандарт NT-IGFBP-4 с концентрацией 300 нг/мл), и проводили серию разведений в Assay буфере (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 0.01% Tween 40, pH 7.8) в 3, 9, 27, 81, 243 и 729 раз, после чего добавляли 50 мкл детекторных антител с концентрацией 2 мкг/мл, приготовленных на Assay буфере и инкубировали в течение 40 минут при постоянном перемешивании. Затем промывали лунки 6 раз промывочным раствором. Далее в лунки вносили раствор для усиления флуоресценции Lanfia (50 мМ глицин-NaOH, 1 М NaCl, 1.75 М NaSCN, 5 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 5% глицерин, 20% пропанол-1, pH 10.0) и инкубировали планшеты в течение 3 минут при перемешивании. Уровень сигнала флуоресценции (CPS) в лунках измеряли с использованием Victor 1420 Multilabel counter, протокол Europium. Полученные значения нормировали для каждой опытной пробы на количество белка в лунке, определённое методом Бредфорд [5].

**Иммуноцитохимическое окрашивание первичных культур нервной ткани.** Из лунок культуральных планшетов отбирали кондиционированную среду, трижды промывали ФСБ и инкубировали с 4% ПФА, приготовленным на ФСБ в течение 10 минут при комнатной температуре для фиксации клеток. Далее клетки инкубировали с 0.1% Тритоном X-100, приготовленным на ФСБ для пермеабилзации клеточных мембран в течение 15 минут при комнатной температуре. После этого клетки трижды промывали ФСБ и инкубировали с блокировочным буфером, содержащим ФСБТ (ФСБ, 0.5% Tween 20, рН 7.4) и 1% ФБС (фетальная бычья сыворотка) в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее проводили инкубацию с первичными антителами (специфичными к GFAP и S100B) с концентрацией 2 мкг/мл, приготовленными на блокировочном буфере и инкубировали в течение ночи при +4°C.

На следующий день лунки повторно промывали ФСБТ и инкубировали с вторичными антителами, специфичными к Fc фрагментам антител мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa-594 и раствором фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (концентрации подобраны в соответствии с рекомендациями производителей), приготовленных на блокировочном буфере. Инкубацию проводили в течение 2 часов при комнатной температуре, затем трижды промывали ФСБТ. Вносили в лунки DAPI с концентрацией 0.5 мкг/мл, приготовленный на ФСБ, инкубировали в течение 10 минут, после чего трижды отмывали лунки ФСБ с 0.1% NaN<sub>3</sub>, заворачивали планшеты в фольгу и хранили полученные препараты при +4°C. Окрашенные препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus FV-300 (США).

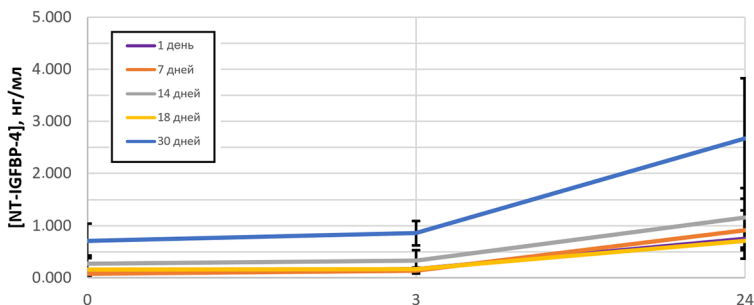
**Результаты и обсуждение.** В качестве модели исследования мы использовали первичную культуру клеток головного мозга, которую получали из 1, 7, 14, 18 и 30-дневных крыс. На первом этапе работы полученные культуры были охарактеризованы методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием специфических антител к маркерам астроцитов – глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и белку S-100B (см. рис. 1), а также маркеру нейронов – β-III-тубулину (данные не представлены). Содержание астроцитов и нейронов для всех полученных культур составило около 95% в случае астроцитов и 3% в случае нейронов, соответственно (см. рис. 1).



**Рис. 1.** Иммуноцитохимическое окрашивание первичной культуры головного мозга крыс разного возраста. Хроматин выявлен с использованием DAPI (А), актин – с использованием фаллоидина-Alexa-488 (Б), GFAP и S100B – с использованием антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa-555(В, Д). Г и Е – наложение изображений, сделанных в трех флуоресцентных каналах в случае окрашивания клеток GFAP и в случае окрашивания их S100B при одинаковом увеличении.

Далее для исследования динамики протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кондиционированной среде культур, полученных из 1, 7, 14, 18 и 30-дневных крыс было проведено расщепление IGFBP-4 и определена концентрация NT-IGFBP-4. К клеткам добавляли субстратную

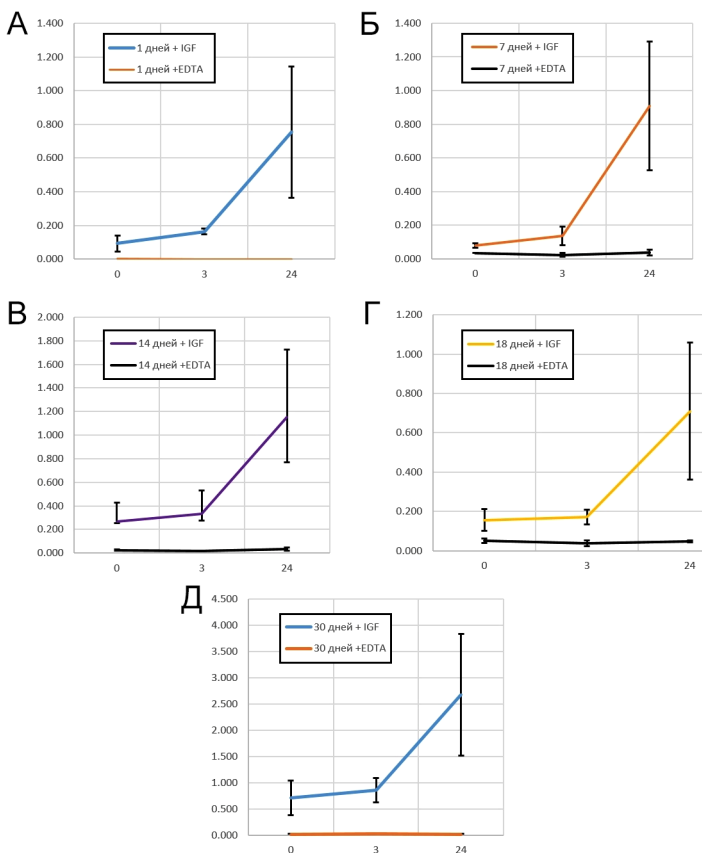
смесь, содержащую IGFBP-4, IGF2 и ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , инкубировали 0, 3 и 24 часа, после чего определяли концентрацию N-концевого фрагмента IGFBP-4 (NT-IGFBP-4) методом ФИА «сэндвич»-типа с использованием антител, специфически распознающий «неоэпитоп», образующийся в результате протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A.



**Рис. 2.** Образование NT-IGFBP-4 в ходе протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде клеток первичной культуры головного мозга крыс разных возрастов. Данные представлены как среднее  $\pm$  квадратичное отклонение,  $n = 4$ .

Как видно, на рис. 2, концентрация NT-IGFBP-4 фрагмента на «старте» протеолитической реакции возрастает по мере увеличения возраста крыс в диапазоне от 0.1 нг/мл в случае 1-дневных крыс до 1 нг/мл в случае 30-дневных крыс. Вероятно, это может быть связано с присутствием эндогенного IGFBP-4, который может быть секретирован клетками мозга крыс. Концентрации фрагмента NT-IGFBP-4 в кондиционированной среде через 3 и 24 часа после начала протеолитической реакции также увеличиваются по мере взросления крыс. Так, уровень PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 у 30-дневных крыс через 24 часа после старта протеолитической реакции возрастает приблизительно в 2 раза и в 3 раза по сравнению с крысами 14-дневного и 1-дневного возраста, соответственно.

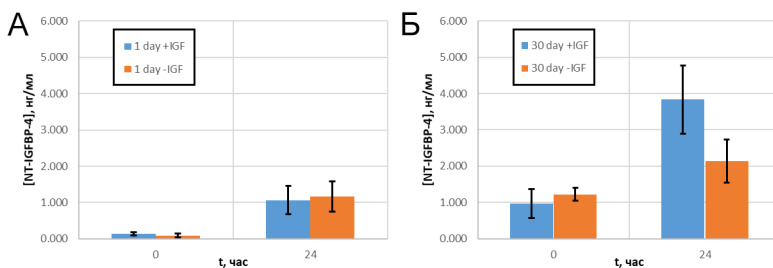
Известно, что протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A не происходит в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Мы провели реакцию протеолитической деградации IGFBP-4 под действием PAPP-A в присутствии и отсутствии 5 мМ ЭДТА (рис. 3). Как видно из представленных на рис. 3. результатов, проведение протеолитической реакции в присутствии 5 мМ ЭДТА полностью ингибирует PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в первичной культуре клеток головного мозга, полученной из крыс всех возрастов, используемых в работе, что говорит нам о том, что наблюдаемый протеолиз ассоциирован с PAPP-A.



**Рис. 3.** Протеолиз IGFBR-4 под действием PAPP-A в первичной культуре клеток мозга крыс разных возрастов, проведенный в присутствии 5 мМ ЭДТА. А – однодневные крысы, Б – 7-дневные крысы, В – 14-дневные крысы, Г – 18-дневные крысы, Д – 30-дневные крысы.

Мы также определили концентрации NT-IGFBR-4 в первичных культурах головного мозга крыс разных возрастов в присутствии и в отсутствии IGF2 (рис. 4А, Б). Известно, что протеолиз IGFBR-4 под действием PAPP-A может происходить преимущественно в условиях, когда IGFBR-4 находится в комплексе с IGF2. Однако в первичной культуре мозга крыс высокие концентрации NT-IGFBR-4 детектируются и в отсутствии IGF (рис. 4А). Вероятно, это связано с высоким уровнем секреции клетками IGF, особенно у особей 1-дневного возраста. В случае более взрослых особей (например, возраста 30 дней) (рис. 4Б)

протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A в отсутствие IGF протекает примерно в 2 раза хуже, что по-видимому вызвано снижением секреции IGF клетками мозга крыс по мере их взросления.



**Рис. 4.** Образование NT-IGFBP-4 в ходе протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде культур головного мозга 1-дневного (А) и 30-дневного возраста (Б), в присутствии и отсутствии IGF2. Данные представлены как среднее  $\pm$  квадратичное отклонение,  $n = 3$ ).

Таким образом, по результатам экспериментов, представленных на рис. 2-4. можно сделать вывод о том, что протеолиз IGFBP-4, наблюдаемый нами в кондиционированной среде первичных культур головного мозга крыс разных возрастов, ассоциирован с PAPP-A и его уровень увеличивается по мере взросления особей. Вероятно, усиление протеолитического расщепления IGFBP-4 в головном мозге крыс с увеличением их возраста связано с необходимостью активации нейропротекторных механизмов, необходимых для поддержания функционирования нейронов и астроцитов. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с результатами Conover and Bale, показавших усиление протеолитической активности PAPP-A при направленном старении адипоцитов [7] и открывают дальнейшие перспективы исследования роли PAPP-A в процессах, сопровождающих старение головного мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дя Г.А., Клычников О.И., Адашева Д.А. и др. // Успехи биологической химии. 2023. 63: 207-44.
2. Dya G.A., Lebedeva O.S., Postnikov A.B. et al. // IUBMB-FEBS-PABMB Congress, Lisbon, Portugal.
3. Hjortebjerg R. // Growth Horm IGF Res. 2018. 41: 7-22.
4. Laursen L.S., Overgaard M.T., Sørensen R. et al. // FEBS Lett. 2001. 504(1-2):
5. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. 72: 248-54.
6. Van Zeller M., Sebastião A.M., Valente C.A. // Biomolecules. 2022. 12(5): 666.
7. Conover C.A., Bale L.K. // Exp. Gerontol. 2023. 172: 112070.

# ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ SERCA ПРИ НЕДЕЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И УТОМЛЯЕМОСТЬ *M. SOLEUS* КРЫС W1STAR

Зарипова К.А., Белова С.П., Шарло К.А., Львова И.Д., Тыганов С.А.,  
Шенкман Б.С., Немировская Т.Л.

ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

**Введение.** При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушающегося баланса между синтезом и деградацией белка. Высокий уровень кальция в цитозоле был обнаружен в модели вывешивания крыс [1,2]. Он активует кальций-зависимые протеазы (например кальпаин), что ведёт к белковой деградации [3]. Накапливающийся в цитоплазме мышечных волокон кальций активно откачивается в саркоплазматический ретикулум с помощью «насоса» SERCA (Ca<sup>2+</sup>-АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума). Мы предположили, что при функциональной разгрузке SERCA инактивируется, из-за чего кальций может накапливаться в цитоплазме и активировать катаболические сигнальные пути. Для проверки гипотезы о роли снижения активности SERCA при функциональной разгрузке в регуляции клеточных сигнальных путей и снижении сократительных характеристик мышц был применён CDN1163 (специфический аллостерический активатор насоса SERCA). Крыс Wistar разделили на 3 группы по 7 крыс (Контроль, С; группа вывешивания (7HS) и группа вывешивания с препаратом (7CDN)).

**Результаты.** Мы не обнаружили предотвращения атрофии *soleus* в группах 7HS и 7CDN при сравнении с группой контроля. Однако при исследовании сократительных свойств изолированной *soleus* мы обнаружили существенные различия между группами. В группе 7-ми суточного вывешивания (7HS) мы наблюдали значительное снижение механических свойств изолированной *m. soleus* по сравнению с группой контроля ( $p < 0.05$ ). Хроническое введение активатора SERCA CDN1163 позволило предотвратить снижение утомляемости мышцы и ряда пассивных механических свойств в группе 7CDN. Эти результаты можно объяснить влиянием нескольких факторов. 1. Снижение экспрессии кальпаина-1 при введении препарата вывешенным крысам (группа 7CDN). Активность кальпаина зависит от концентрации ионов кальция. Кальпаин разрушает цитоскелетные белки, что могло быть предотвращено в этой группе. 2. Предотвращение снижения экспрессии мРНК маркеров биогенеза митохондрий (PGC-1 $\alpha$  и COXII) в группе 7CDN относительно гр. С, что также может иметь отношение к предотвращению падения

выносливости мышцы. В гр. 7HS эта экспрессия снижалась ( $p < 0.05$ ). Также 7-суточная функциональная разгрузка привела к снижению содержания митохондриальной ДНК и белка-маркера митохондриальной плотности TOM20 в группе 7HS на 43% и 60% соответственно в сравнении с группой С ( $p < 0.05$ ). В группе 7HS+CDN содержание TOM20 и митохондриальной ДНК не имело достоверных отличий от группы С. 3. Процент медленных мышечных волокон достоверно снизился в группе 7HS в сравнении с группой С (с 74% до 59%), в то время как в группе 7HS+CDN процент медленных мышечных волокон составлял 68% и не имел достоверных отличий от группы С., что также могло вести к предотвращению утомляемости мышцы.

**Выводы.** Можно заключить, что введение активатора SERCA при 7-дневном вывешивании крыс предотвращает снижение утомления *m. soleus* относительно группы, вывешенной без препарата. Вероятно, это происходит благодаря предотвращению падения содержания медленных изоформ ТЦМ, снижению экспрессии кальпаина 1 и повышению экспрессии PGC1 $\alpha$ , а также митохондриальных ферментов.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00228.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B. // J. Appl. Physiol. (1985). 1999. 87(1): 386-90.
2. Hu N.F., Chang H., Du B. et al. // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2017. 42: 117-27.
3. Shenkman B.S., Belova S.P., Lomonosova Y.N. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2015. 584: 36-41.

## РОЛЬ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КАНАЛОВ SERCA В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛИНГА ПРИ ТРЕХСУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ КРЫС

*Зарипова К.А., Белова С.П., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л.*

Институт медико-биологических проблем, Москва, Россия

**Введение.** При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности, а также при длительном лишении человека обычной двигательной активности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушающегося баланса между синтезом и деградацией белка. Мы предположили, что АТФ и «медленный» Ca<sup>2+</sup> могут стимулировать запуск этих процессов. В скелетных мышцах деполаризующие стимулы индуцируют как быстрый



сигнал кальция, связанный с сокращением, так и медленный сигнал, который регулирует экспрессию генов. Высокий уровень кальция в цитозоле был обнаружен в модели вывешивания крыс [1,2]. Он активирует кальций-зависимые протеазы (например кальпаин), что ведёт к белковой деградации [3]. Накапливающийся в цитоплазме мышечных волокон кальций активно откачивается в саркоплазматический ретикулум с помощью «насоса» SERCA (Ca<sup>2+</sup>-АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума). Это активный процесс, т.к. кальций закачивается в саркоплазматический ретикулум против градиента концентрации, и для этого используется кальций-зависимый гидролиз АТФ. Мы предположили, что при функциональной разгрузке SERCA инактивируется, из-за чего кальций может накапливаться в цитоплазме и активировать катаболические сигнальные пути.

Для проверки гипотезы о роли снижения активности SERCA при ограничении функциональной активности мышц в регуляции клеточных сигнальных путей и снижении сократительных характеристик мышц был применён CDN1163 (специфический активатор SERCA) в модели функциональной разгрузки. При моделировании функциональной разгрузки скелетных мышц использовалась методика Ильина-Новикова в модификации Morey-Holton. Для эксперимента были взяты 24 самца крыс линии Wistar, которые были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: С – контроль; HS – трехдневное вывешивание; CDN – трехдневное вывешивание с введением CDN1163 (50 мг/кг веса животного, внутривенно). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 584) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

**Результаты.** После 3 суток вывешивания в группе HS мы обнаружили достоверное снижение веса камбаловидной мышцы относительно группы С, однако в группе CDN снижение было меньше, чем в гр. без препарата HS ( $p < 0.05$ ). Содержание АТФ в группе HS было на 24% выше, чем в гр. С ( $p < 0.05$ ). Введение активатора SERCA в группе 3CDN предотвратило эти изменения. При вывешивании на фоне накопления АТФ наблюдается тенденция к снижению фосфорилирования АМПК. При этом в группе CDN, где предотвращено накопление АТФ, наблюдается увеличение фосфорилирования АМПК в два раза по сравнению с вывешиванием без введения препарата, указывая на корреляцию активности АМПК и накопления АТФ. Так как SERCA регулирует содержание ионов кальция в миоплазме, было определено содержание ведущих маркёров кальций-зависимых сигнальных путей. В группе HS наблюдалось увеличение фосфорилирования CaMKII на 204% и содержания IP3R на 41% относительно группы контроля ( $p < 0.05$ ). Введение CDN на фоне вывешивания предотвращает увеличение фосфорилирования CaMKII и содержания IP3R. Ранее показано, что IP3R-

зависимые медленные сигналы  $Ca^{2+}$  могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ фенотипа медленных и быстрых мышечных волокон.

Мы оценили уровни экспрессии *ключевых* в атрофическом процессе убиквитина и E3-убиквитинлигаз. Экспрессия мРНК убиквитина и E3-убиквитинлигаз MuRF1, MAFbx и Cbl-b была существенно повышена в группе HS относительно контроля на 158, 37, 136 и 101% соответственно. Введение препарата при 3-х дневном вывешивании предотвратило увеличение экспрессии мРНК MurF1 (но не MAFbx) и существенно снизила увеличение экспрессии Cbl-b и убиквитина в группе с введением препарата (CDN) ( $p < 0.05$ ). Экспрессия E3-убиквитинлигаз может регулироваться несколькими транскрипционными факторами, например, MYOG, FOXO3. Уровень фосфорилирования FoxO3 был одинаково снижен во всех вывешенных группах (HS и CDN) относительно группы контроля. Экспрессия MYOG была повышена в группе HS на 14% относительно контроля ( $p < 0.05$ ). В группе CDN уровень мРНК MYOG не отличался от группы контроля. Таким образом, предотвращение экспрессии E3-лигазы MuRF1 при введении активатора SERCA связано со снижением транскрипционной активности миогенина.

Анализ маркеров анаболического сигналинга показал, что уровень фосфорилирования p-p70S6K не менялся при 3-х дневном вывешивании крыс, а фосфорилирование 4E-BP и P90RSK было одинаково снижено в обеих вывешенных группах – HS и CDN. Однако, фосфорилирование сайтов рибосомного белка S6 (Ser240/244) и Ser235/236 было снижено только в группе HS на 83 и 55% соответственно по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ), а введение препарата предотвратило это снижение. Уровень фосфорилирования eEF2 растет на 148% в группе HS по сравнению с контрольной группой, что снижает скорость процессов элонгации в ненагруженных мышцах. Введение активатора SERCA полностью предотвратило увеличение фосфорилирования eEF2. GSK-3 $\beta$  может регулировать как анаболические, так и протеолитические процессы, поскольку является эндогенным ингибитором синтеза белка и промотором деградации белка. Мы обнаружили снижение фосфорилирования GSK-3 $\beta$  в группе HS на 26% относительно группы контроля ( $p < 0.05$ ), которое было полностью предотвращено введением CDN1163.

**Вывод:** при 3-дневной функциональной разгрузке *m. soleus* введение активатора SERCA не влияло на маркёры mTORC1-зависимого сигналинга, но предотвращало снижение фосфорилирования анаболических маркёров – GSK3b, eEF2 и белка S6 малой субъединицы рибосомы, что в совокупности могло способствовать улучшению эффективности трансляции. Транскрипционные факторы FoxO3 и MYOG активируются при функциональной разгрузке *m. soleus*, но к регуляции экспрессии E3 лигаз MurF1 и Cbl-b при активировании SERCA может

иметь отношение MYOG. Активатор SERCA CDN1163 влияет на регуляцию Са-зависимых сигнальных путей при мышечной разгрузке, через изменение фосфорилирования СаМКП и уровня IP3R.

Работа выполнена при финансировании гранта РНФ № 21-15-00228.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B.* // J. Appl. Physiol. (1985). 1999. 87: 386-90.
2. *Hu N.F., Chang H., Du B. et al.* // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2017. 42: 117-27.
3. *Shenkman B.S., Belova S.P., Lomonosova Y.N. et al.* // Arch. Biochem. Biophys. 2015. 584: 36-41.

## ЭНДОКРИННАЯ ФУНКЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ

*Захарова А.Н.<sup>1</sup>, Милованова К.Г.<sup>1</sup>, Орлова А.А.<sup>1</sup>, Дьякова Е.Ю.<sup>1</sup>,  
Калинникова Ю.Г.<sup>1</sup>, Коллантай О.В.<sup>1</sup>, Капилевич Л.В.<sup>1</sup>, Чибалин А.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Департамент молекулярной медицины и хирургии, секция интегративной физиологии, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

**Введение.** В настоящее время широко обсуждается вопрос эндокринной функции скелетных мышц и влияния факторов физической нагрузки на организм. Изучение влияния этих факторов представляет значительный интерес для коррекции различных нарушений и лечения заболеваний.

Особенно актуальным остается вопрос немедикаментозного лечения метаболических расстройств, в том числе при помощи физических нагрузок. Метаболические изменения под влиянием физических нагрузок – это очень сложный процесс, который одновременно включает интегративные и адаптивные реакции в нескольких тканях и органах на клеточном и системном уровне [1]. В современной науке значительное внимание уделяется применению физических упражнений для лечения и профилактики многих заболеваний [2].

В настоящем исследовании представлены результаты изучения продукции миокинов у мышечных клеток на фоне сахарного диабета 2 типа с учётом возрастного и биоритмологического фактора. Также исследована продукция ряда факторов метаболизма в мышечных клетках.

**Организация и методы исследования.** В данном эксперименте использовались мыши линии C57 BL6 Black в возрасте 4 и 32 недели. Для моделирования сахарного диабета использовалась высокожировая и высокоуглеводная диета. В качестве физической нагрузки применялся бег на беговой дорожке в разное время суток в течение 4-х недель.

Концентрация миокинов в мышечной ткани *m. gastrocnemius* определялась методом иммуноферментного анализа. Содержание инсулина в крови определялось методом иммуноферментного анализа. Содержание цитратсинтазы (CS), белков системы OXPHOS, GLUT-4 проводилось при помощи вестерн-блот анализа.

**Результаты и обсуждение.** Метаболические расстройства, моделируемые с помощью высокожировой диеты, влияли на содержание миокинов в мышечной ткани. Содержание всех исследованных миокинов, кроме LIF, снижалось, при этом концентрация CLCX1 снижалась только у молодых животных.

После регулярных нагрузок в виде принудительного бега мы наблюдали разнонаправленные изменения концентрации миокинов в мышечной ткани. Содержание IL-6 изменялось наиболее существенно, эти изменения наблюдались во всех группах животных и в наибольшей степени зависели от схемы предъявления нагрузок. Влияние физических нагрузок на содержание IL-15 в мышечной ткани регистрировалось в основном у мышей старого возраста. У молодых животных физические нагрузки приводили к увеличению концентрации LIF в мышечной ткани, если применялись по схеме тренировки в вечернее время или при попеременном режиме тренировки. В группе эффект высокожировой диеты был выражен существенно сильнее, чем в группе с нормальным типом питания. Содержание CXCL1 не изменялось при применении принудительного бега практически во всех группах животных.

Наиболее выраженный эффект принудительного бега на концентрацию миокинов в мышечной ткани отмечался при использовании тренировки в вечернее время или при попеременном режиме. Эффект схемы тренировки в утреннее время был выражен гораздо слабее.

В группе возрастным мышей отмечен более низкий уровень CS во всех группах в сравнении с молодыми мышами. Также следует отметить, что у молодых мышей выявлено увеличение CS на фоне физической нагрузки, особенно при утренних тренировках, тогда как у старых мышей в группе с нормальным питанием произошло снижение показателя, а в группе с высокожировой диетой наоборот увеличение. По показателям системы OXPHOS отмечены разнонаправленные реакции. Однако, следует подчеркнуть наиболее значительное влияние вечернего и попеременного режима тренировки.

Принудительные физические нагрузки в виде ежедневного бега на тредмиле оказывают целый ряд выраженных эффектов на метаболизм у мышей с моделью сахарного диабета II типа. Прежде всего это проявляется в снижении массы тела, которое проявлялось в большей степени у молодых животных и зависит от фазы суток, в которые выполняется нагрузка. Так же физические нагрузки сопровождаются возрастанием скорости усвоения глюкозы, причем в большей степени у возрастных мышей, и значительным повышением концентрации инсулина.

Все изложенное свидетельствует о нормализации углеводного обмена под влиянием регулярных физических нагрузок и инволюции изменений, характерных для диабета II типа. Причем механизм этих изменений связан с одним из основных патогенетических факторов диабета – жировая диета у мышей сопровождается снижением содержания GLUT-4 в мышечной ткани, а принудительные физические нагрузки – напротив, его увеличением. Увеличение содержания GLUT-4 на фоне физических нагрузок подтверждено в ряде исследований.

Во время физической нагрузки выработка GLUT-4 увеличивается, что способствует улучшению чувствительности к инсулину. Улучшенная чувствительность к инсулину, в свою очередь, увеличивает поглощение глюкозы и, наконец, улучшает гликемический контроль [3]. Это улучшение чувствительности к инсулину способствует улучшению гликемического контроля до нормального диапазона [4].

Однако в нашем исследовании было выявлено, что в группе молодых мышей на нормальном и жировом корме наблюдается разнонаправленная реакция по содержанию GLUT-4 на фоне физической нагрузки. У мышей на нормальном корме выявлено снижение, тогда как у мышей на высокожировой диете наоборот увеличение уровня GLUT-4. При этом наибольшее увеличение выявлено в группе мышей, тренирующихся в утреннее время.

У старых мышей отмечено увеличение уровня GLUT-4 на фоне физической нагрузки. Таким образом нормализация углеводного обмена у возрастным мышей может быть связана с тем, что на фоне физических нагрузок происходит увеличение уровня GLUT-4.

Механизмы описанных эффектов физической нагрузки многие авторы связывают с активно изучаемой в последнее десятилетие эндокринной функцией скелетных мышц [5,6]. Доказана взаимосвязь сократительной активности скелетных мышц с процессами транскрипции [7]. Одним из ключевых факторов эндокринной функции скелетных мышц рассматриваются миокины [8,9,11]. В то же время показана возможная роль изменения трансмембранных градиентов ионов натрия и калия в этих процессах [10].

Миокины, попадая в системный кровоток, могут оказывать различное воздействие на энергетический обмен. В исследованиях выявлено влияния некоторых миокинов на энергетический обмен. В частности, интерлейкин-6 цитокин, который может высвобождаться при тренировке скелетных мышц. После связывания со своим рецептором миокин IL-6 активирует путь PI3K-Akt. Одним из следствий этой активизации является потенцирование передачи сигналов инсулина, что повышает чувствительность к инсулину. IL-6 увеличивает мобилизацию везикул GLUT-4 на периферию мышечной клетки, увеличивая транспорт глюкозы в клетку, а также синтез гликогена. Таким образом, данный миокин может являться тем фактором, который обеспечивает изменение энергетического обмена на фоне физических нагрузок [12].

Физическая активность, внедряемая с учетом циркадианных ритмов и возрастных особенностей, является перспективным способом воздействия на метаболические процессы как на клеточном, так и на системном уровне, что важно для поиска новых путей коррекции метаболических нарушений.

Исследование выполнено при поддержке программы развития Томского государственного университета (Приоритет 2030).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Huh J.Y. // Arch. Pharm. Res. 2018. 41(1): 14-29.
2. Hansen D., Niebauer J., Cornelissen V. et al. // Sports Med. 2018. 48: 1781-97.
3. Mann S., Beedie C., Balducci S. et al. // Diabetes Metab. Res. Rev. 2014. 30:257-68.
4. Medscape: diabetes mellitus and exercise; 2010. Available from: <https://www.medscape.com/viewarticle/717051>. Accessed July30, 2020.
5. Iizuka K., Machida T., Hirafuji M. // J. Pharmacol. Sci. 2014. 125: 125-31.
6. Pedersen B.K., Febbraio M.A. // Nat. Rev. Endocrinol. 2012. 8: 457-65.
7. Hansen J.S., Zhao X., Irmeler M. et al. // Diabetologia. 2015. 58: 1845-54.
8. Kapilevich L., Zakharova A., Kabachkova A. et al. // FEBS J. 2017. 284(S1): 373.
9. Kapilevich L.V., Zakharova A.N., Kabachkova A.V. et al. // Front. Physiol. 2017. 8: 35.
10. Kapilevich L.V., Kironenko T.A., Zaharova A.N. et al. // Genes Dis. 2015. 2: 328-36.
11. Zakharova A.N., Kironenko T.A., Milovanova K.G. et al. // Frontiers in Psychology. 2021. 12: 1-13.
12. de Melo Madureira Á.N., de Oliveira J.R.S., de Menezes Lima V.L. // Mini Rev. Med. Chem. 2022. 22(18): 2419-28.

# ПРИЖИЗНЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ПОСЛЕДСТВИЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА МЫШИ: ШИРОКОПОЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Кислухина Е.Н.<sup>1</sup>, Лизунова Н.В.<sup>1,2</sup>, Шарипов Р.Р.<sup>3</sup>, Бакаева З.В.<sup>1,4</sup>,  
Попова И.Ю.<sup>5</sup>, Пинелис В.Г.<sup>1</sup>, Сурин А.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия.

<sup>5</sup>ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, Пущино, Россия

**Введение.** Инсульт – тяжелое заболевание, ассоциированное с высоким уровнем смертности и тяжелыми отдаленными последствиями: нарушением сенсорных, моторных и когнитивных функций головного мозга. Фокальная ишемия приводит к быстрой гибели нервных клеток в результате кислородно-глюкозного голодания, в результате чего образуется очаг некроза. Живые клетки вокруг зоны некроза подвергаются воздействию целого комплекса негативных факторов: ишемия, повышенная концентрация глутамата, формирование областей избыточной концентрации ионов  $K^+$  и метаболический стресс в результате распространяющейся кортикальной депрессии. Таким образом, вокруг зоны некроза формируется переходная область – зона пенумбра – клетки которой некоторое время сохраняют жизнеспособность, но впоследствии могут погибнуть [1].

Ишемическое повреждение мозга и его последствия активно изучают на животных моделях, однако классические биохимические и гистологические методы не позволяют наблюдать динамику процессов *in vivo*, за исключением изменений концентраций аналитов, которые можно определять в крови. Построение временной динамики процессов требует использования большого количества животных и их забоя в различные промежутки времени после индукции ишемии [2].

Использование нового методического подхода – широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) [3] – позволило наблюдать изменения в ткани мозга *in vivo* в течение недели после фотоиндуцированной ишемии у мышей. Индивидуально для каждого животного была построена временная динамика размера пораженной зоны.

**Материалы и методы.** В экспериментах была использована линия трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах флуоресцентный сенсор  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP6f – линия C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393).

Для измерений методом ШОН животным в возрасте 4-6 недель проводили операцию «прозрачный череп». Вкратце, животных анестезировали (Золетил 100 100 мг/кг + Ксила 8 мг/кг в 0.9% NaCl в/б (Virbac Sante Animale, Франция; Interchemie werken De Adelaar B.V., Эстония)), удаляли кожные покровы с дорзальной поверхности черепа и микродрелью со стоматологическими полирами истончали кости. Взамен удаленной костной ткани наносили слой прозрачного полимера. Крепили титановый холдер, который впоследствии позволял фиксировать голову мыши в штативе. В течение 4 дней вводили обезболивающее (Кетонал 8.5 мг/кг в 0.9% NaCl п/к) и антибиотик (Марбобел 8 мг/кг в dH<sub>2</sub>O п/к). Реабилитационный период составил 30 дней.

Сам метод ШОН заключается в съемке активности коры больших полушарий на видеокамеру через объектив мезоскопа. Флуоресцентный сигнал сенсора кальция отображает электрическую активность мозга. Изменения светопоглощения ткани отображают изменения притока крови. Для измерения использовали следующие параметры: GCaMP6f возбуждение/испускание 470/525 ± 25 нм 20 Гц, общий гемоглобин – рассеивание 505 нм, 20 Гц (Chroma, Mightex, США). На время измерений бодрствующую мышшь помещали в установку, обеспечивающую иллюзию свободного передвижения (Neurotag, Финляндия).

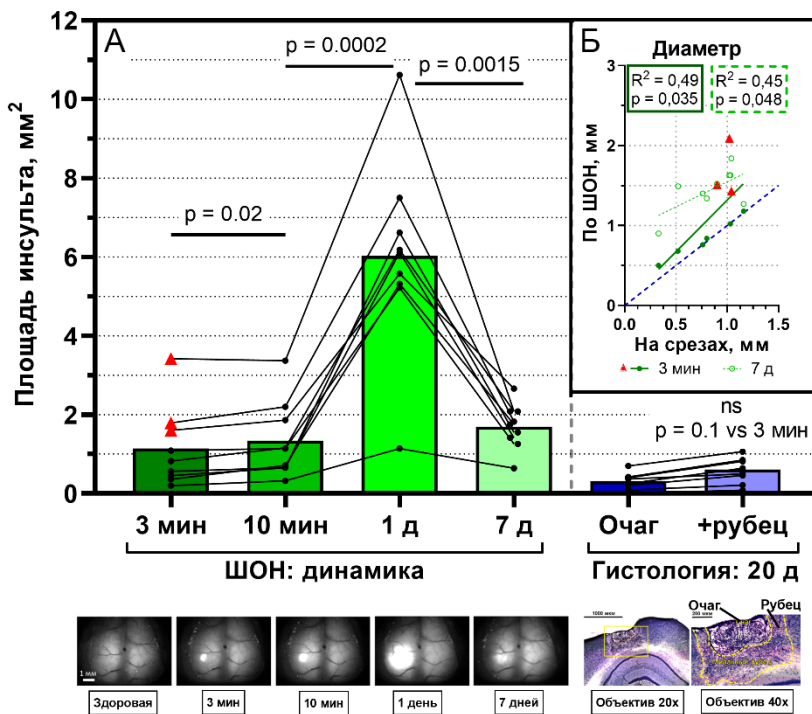
Животных разделили на 2 группы: «Контроль» и «ФТ» (n = 9). Моделирование инсульта проводили методом фотоиндуцированной ишемии (ФИ). Для этого за день до индукции ишемии проводили катетеризацию яремной вены. Параметры модели: бенгальский розовый 20 мг/кг в/в; лазер 532 нм, 10 мВт, диаметр пучка 2 мм, освещение 10 мин.

Для гистологического анализа образцы головного мозга фиксировали в 10% формалине рН = 7.4 (Биовитрум, Россия). Срезы толщиной 35 мкм нарезали при помощи вибратора Leica vt1200s (Leica, Германия). Затем проводили окрашивание по Нисслю (Servicebio, Китай).

**Результаты и обсуждение.** Площадь пораженной поверхности мозга является важным показателем степени тяжести повреждения. Размер поражения был измерен двумя способами: классическим гистологическим методом в конце эксперимента и по ШОН в динамике (рис. 1).

У здоровых животных интенсивность флуоресценции GCaMP6f довольно равномерна по поверхности коры больших полушарий. В группе «Контроль» средний уровень флуоресценции и амплитуда его флукуаций не изменялись после ложной ФИ (средняя амплитуда ± 2.2%, разброс от -9.6 до 9.6% относительно среднего уровня,  $\Delta F/F_0 \times 100\%$ , n = 9).

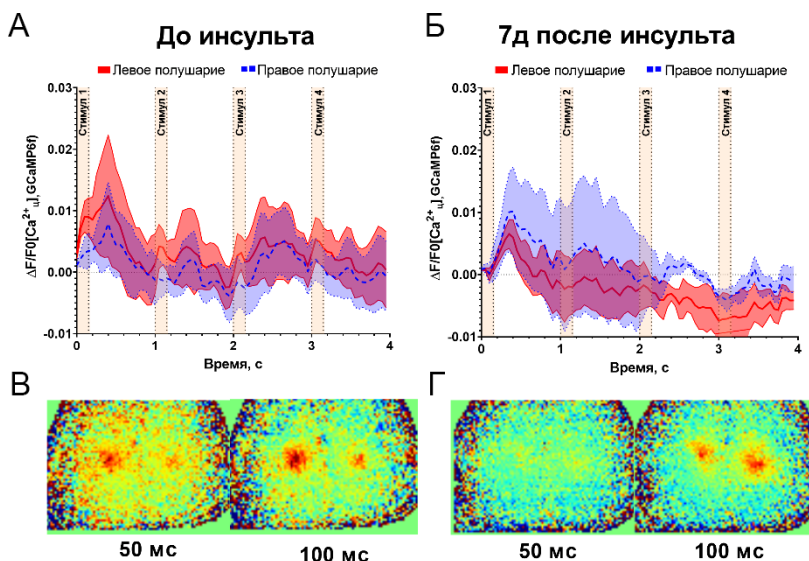




**Рис. 1.** Размер пораженной области, определенный по ШОН и гистологически. Представлены площадь (А) и диаметр (Б) зоны повреждения. В нижнем ряду приведены репрезентативные изображения. В целом, наблюдается соответствие между измерениями по ШОН на 3-ей мин после ФИ и гистологическими данными, однако ШОН может давать завышенные значения при наличии засветки на фотографиях (обозначены красными треугольниками). Two-way ANOVA, корреляция Пирсона, t-тест Стьюдента.

В группе «ФТ» наблюдали резкое (более, чем на 200%, по сравнению с исходным) увеличение флуоресценции сенсора  $Ca^{2+}$  в центре очага ишемии. Это свидетельствует о значительном повышении цитоплазматической концентрации ионов  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_c$ ) в клетках ишемического ядра. Размер данной области динамически изменялся, расширяясь от 3 к 10 мин после ФИ и значительно – к первым суткам после ФИ ( $1.14 \pm 0.34$  мм<sup>2</sup>,  $1.34 \pm 0.33$  мм<sup>2</sup> и  $6.03 \pm 0.82$  мм<sup>2</sup>, соответственно; представлены ср. ар.  $\pm$  ст. ош. ср.;  $p = 0.02$  и  $0.0002$ , соответственно,  $n = 9$ , Two-way ANOVA с поправкой Тукей). От 1-х к 7-м суткам после ФИ наблюдалось снижение площади поражения до  $1.69 \pm 0.19$  мм<sup>2</sup> ( $p = 0.0015$ ).

Подобная динамика позволяет предположить, что область, в которой  $[Ca^{2+}]_c$  резко повысилась в течение первых 24 ч после ФИ и затем восстановилась до исходного уровня представляет собой зону пенумбра. Область же, в которой повышение  $[Ca^{2+}]_c$  было необратимо, предположительно, представляет собой некротическое ядро. Остаточная флуоресценция к 7 д после ФИ может представлять собой свечение GCaMP6f, попавшего в межклеточное пространство из разрушенных нейронов или поглощенного иммунными клетками.



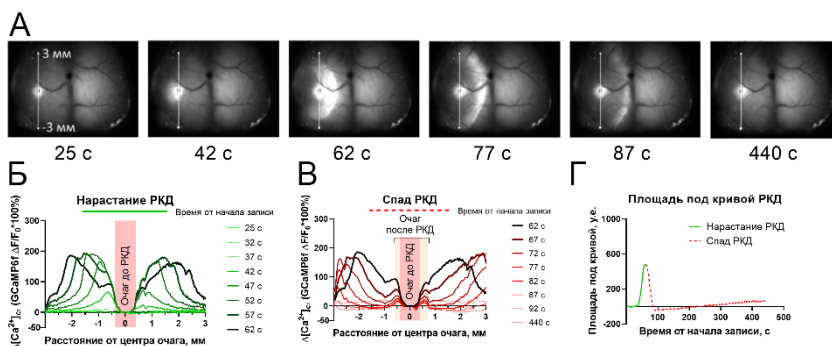
**Рис. 2.** Изменения цитоплазматической концентрации кальция в области коры, отвечающей за чувствительность задних лап, при стимуляции правой задней конечности бодрствующих мышей до инсульта (А) и на 7 день после инсульта (Б). На (В) и (Г) представлены репрезентативные изображения через 50 и 100 мс после начала подачи стимула для 1 и 7 дня, соответственно. Пачки из четырех стимулов (90 мкА, 200 мс, 1 Гц) подавали на лапу мыши через электроды 10 раз с промежутком в 20 секунд. На графике представлена усредненная реакция на пачку стимулов. Ср. ар.  $\pm$  ст. ош. ср.  $n = 3$ .

Описанное выше предположение было проверено путем сравнения размера поврежденной области, определенного по ШОН, с данными гистологического анализа. Как видно из рис. 1, наблюдается соответствие между размером зоны некроза, определенным гистологически, и размером повреждения, определенного по ШОН на 3 мин после ФИ. Стоит отметить, что ШОН может давать завышенные значения (красные треугольники на

рис. 1), что может быть объяснено неоптимальным подбором условий освещения и появлением засветки на фотографиях. Таким образом, можно считать, что площадь поражения, измеренная по ШОН на 3-й мин после ФИ, представляет собой площадь будущего некротического ядра. Разница же между измерениями, сделанными по ШОН на 3-ей мин и через 1д после ФИ, представляет собой зону пенумбра.

Это подтверждается и результатами анализа видеозаписей ШОН. Изменения концентрации кальция, характерные для функционально активной ткани, исчезают на 1 д после ФИ, как в зоне некроза, так и в зоне пенумбры. Однако к 7 дню после ФИ наблюдается кальциевая активность в зоне пенумбры, в частности, возникает ответ на стимуляцию задних конечностей. В зоне некроза ответа не возникает (рис. 2Б, Г).

У здорового животного можно отметить четыре волны подъема  $[Ca^{2+}]_c$ , соответствующие началу подачи каждого стимула (рис. 2А). Наиболее выражен ответ на первый стимул. Ответ на 1-й стимул в левом полушарии, контралатеральном стимулируемой лапе, развивается быстрее, амплитуда ответа, в среднем, выше. На седьмой день после инсульта увеличился латентный период до начала реакции на стимул, и снизилась амплитуда ответа в поврежденном полушарии.



**Рис. 3.** Распространяющаяся кортикальная депрессия. Представлена репрезентативная запись РКД одной мыши (А), график изменений  $[Ca^{2+}]_c$  вдоль прочерченного на (А) отрезка в период нарастания (Б) и спада (В) РКД, а также площадь под этими кривыми в течение всей записи (Г).

ШОН позволяет не только оценивать долговременные последствия инсульта, но и изучать острые эффекты. На рис. 3 представлена одна из зарегистрированных волн распространяющейся кортикальной депрессии (РКД). Протекание РКД в период наблюдения (с 3 по 10 мин ФИ) было отмечено у 5/9 мышей в группе «ФТ».

Характеристика РКД не отличается от описанных ранее [4] в литературе: массовая деполяризация нейронов, детектируемая по увеличению флуоресценции GCaMP6f, распространяется по ишемизированному полушарию, начиная от очага ишемии. За деполяризацией следует период депрессии – снижение активности нейронов в полушарии относительно исходного уровня. Отмечено, что протекание РКД способствует скачкообразному расширению области с повышенной  $[Ca^{2+}]_c$ , тогда как в другие отрезки времени расширение области повышенной  $[Ca^{2+}]_c$  происходит равномерно (рис. 3).

### **Выводы.**

1. Размер пораженной области увеличивается в течение первых суток после ишемии и снижается к 7 суткам после ФИ. Область, регистрируемая ШОН на 3 мин соответствует зоне некроза; разница между 3 мин и 1 д после ФИ соответствует пенумбре.

2. К 7 д после фотоиндуцированной ишемии наблюдается частичное функциональное восстановление ткани в зоне пенумбра. Однако латентный период ответа на сенсорную стимуляцию увеличивается, растет вовлеченность контралатерального полушария в ответ.

3. Распространяющаяся кортикальная депрессия является независимым фактором поражения при фотоиндуцированной ишемии и способствует скачкообразному расширению зоны с повышенной  $[Ca^{2+}]_c$ .

Работа выполнена за счет средств Гос. задания № FGFU-2022-0012, при финансовой поддержке Минздрава России, проект № ААААА19-119012590191-3, а также гранта Минобрнауки России по программе обновления приборной базы НИОКР (№ 08- 07-S6/2021/82930).

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Andrew R.D., Farkas E., Hartings J.A. et al. // *Neurocrit. Care.* 2022. 37(1): 11-30.
2. Labat-gest V., Tomasi S. // *J. Vis. Exp.* 2013. (76): 50370.
3. Padawer-Curry J.A., Bowen R.M., Jarang A. et al. // *Methods Mol. Biol.* 2023. 2616: 113-51.
4. Zhao H.T., Tuohy M.C., Chow D. et al. // *Cell Rep.* 2021. 37(1): 109794.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ FMRF-ПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ В  
РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЕ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ТРЕМАТОД  
(PLATYHELMINTHES)

Кузнецов Г.В.<sup>1</sup>, Крещенко Н.Д.<sup>1</sup>, Кучин А.В.<sup>1</sup>, Яшин В.А.<sup>1</sup>, Мочалова Н.В.<sup>2</sup>,  
Теренина Н.Б.<sup>2</sup>, Гордеев И.И.<sup>3</sup>, Митьковский Д.Е.<sup>4</sup>, Никогосян М.А.<sup>5</sup>,  
Петросян Р.А.<sup>5</sup>, Мовсесян С.О.<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции  
им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,  
Биологический факультет, Москва, Россия

<sup>4</sup>ГОУ СПО Московский областной гуманитарный колледж,  
Серпухов, Россия

<sup>5</sup>Научный центр зоологии и гидроэкологии Национальной академии наук  
Республики Армения, Ереван, Армения

**Введение.** Нервная система играет центральную роль в осуществлении жизненно важных функций паразитических плоских червей, таких как передвижение, поиск хозяина, питание и размножение. В нервной системе Platyhelminthes содержится множество сигнальных молекул, в том числе и нейропептиды [1]. Несмотря на повышенный интерес к изучению нейробиологии этих организмов, функциональное значение нейромедиаторов остается у них малоизученными. Четыре природных FMRFамид-подобных пептида были выделены у плоских червей: YIRF, GYIRF, RYIRF и GNFFRF [2]. Есть данные о том, что FMRF-подобные пептиды оказывают возбуждающее действие на мускулатуру червей [3,4]. Однако обилие пептидергических компонентов и сайты их локализации в организме паразитов, свидетельствуют о том, что эти пептиды могут быть вовлечены в разнообразные физиологические процессы, например, репродуктивные. Большинство паразитических червей являются гермафродитами и имеют сложно устроенную половую систему, включающую как мужские (циррус, сумка цирруса, семенники), так и женские (матка, яичники, желточники, яйцеводы) репродуктивные структуры. Целью настоящей работы является идентификация FMRF-иммунопозитивных (-ип) нервных элементов в отделах половой системы у трех видов трематод, являющихся опасными паразитами человека и животных.

**Материалы и методы.** В работе использовали половозрелых особей паразитических трематод *Prodistomum alaskense* (Leporeadidae), кишечного паразита глубоководных рыб, выловленных в северо-западной

части Тихого океана [5], *Dicrocoelium lanceatum* (Dicrocoelidae), паразита жвачных сельскохозяйственных животных (Армения), а также *Rhipidocotyle campanula* кишечного паразита щуки.

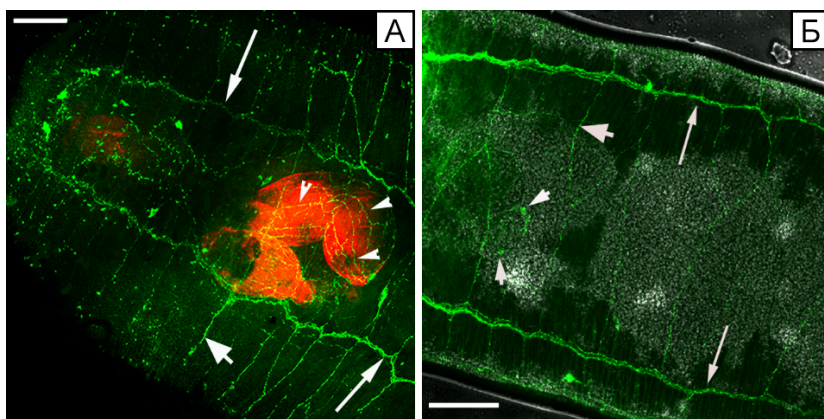
Локализацию пептидергических нервных структур определяли иммуноцитохимически. Образцы инкубировали в течение 5 дней с первичными кроличьими антителами против FMRFамида (Immunostar, США), разведенными 1:500 в растворе PBST, содержащем 0.1 М PBS и 1% ТритонХ-100 (Sigma, США). После промывки в PBST образцы переносили на 5 дней во вторичные флуоресцентно-меченые козы антикроличьи иммуноглобулины (H+L, AlexaFluor488, Immunostar, США), разбавленные 1:400. Все процедуры проводили в темной комнате при 4°C. Мускулатуру окрашивали TRITC-конъюгированным фаллоидином (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:200 в течение 24 часов при 4°C. Контроль включал (1) инкубацию образцов в растворе без первичных антител и (2) замещение иммунной антисыворотки на не иммунную. Контрольные образцы показали отсутствие в тканях неспецифической окраски.

Препараты исследовались с помощью флуоресцентного Leica DM6000 В и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (CLSM) Leica TCS SP5 (Leica Microsystem, Германия). Сканирование проводилось через толщину тотального препарата в 48-86 мкм, шаг сканирования 1.3-2 мкм. Для создания иллюстраций использовалась программа Adobe Photoshop CS2 9.0 (Adobe Systems Inc.).

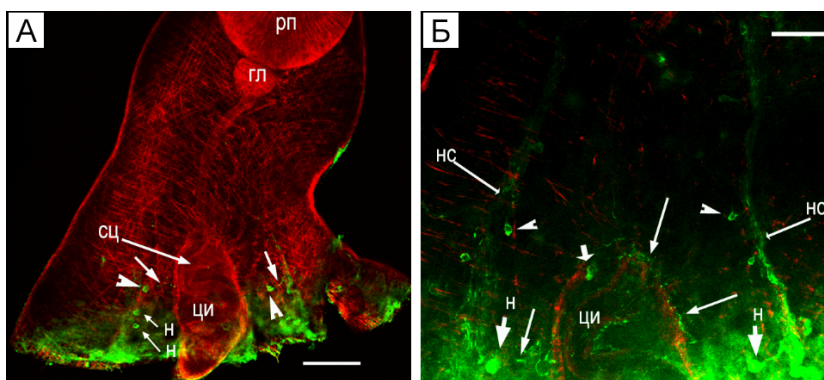
**Результаты.** На тотальных препаратах *P. alaskense* выявлена положительная окраска на FMRFамид в некоторых отделах женской половой системы червя. FMRFa-ип окраска выявляется в области, соответствующей расположению проксимального отдела матки. Также многочисленные тонкие продольные нейриты FMRFa-ип наблюдаются в дистальном отделе матки (рис. 1А). На уровне яичника интенсивное FMRFa-ип окрашивание наблюдается в нескольких мелких телах нейронов, локализованных вокруг протока половой системы (рис. 1Б).

У *Rh. campanula* тонкие FMRFa-ип волокна отходят от нейронов, расположенных в брюшных нервных стволах по направлению к терминальным отделам мужской половой системы червя. По крайней мере один крупный FMRFa-ип нейрон выявлен в области расположения цирруса и сумки цирруса.

Наши результаты показали наличие FMRFa-ип нейронов и их отростков вблизи терминального отдела репродуктивной системы *D. lanceatum*. В дистальном отделе мужской половой системы *D. lanceatum*, а именно, в области цирруса и мешка цирруса обнаружены три небольших FMRFa-ип нейрона. Кроме того, к этому отделу половой системы отходят отростки пары крупных нейронов, расположенных вблизи брюшных нервных стволов и связанных с ними (рис. 2А). В мышечной стенке цирруса, а также сумки цирруса наблюдается присутствие FMRF-ип нервной сети (рис. 2Б).



**Рис. 1.** FMRFa-ип окрашивание (зеленым) в нервной системе *Prodistomum alaskense* (CLSM, оптические срезы), головной (А) и срединный (Б) отделы тела. А – FMRFa-ип нервные волокна в дистальной части матки (острия стрелок), мускулатура окрашена TRITC-меченым фаллоидином (красным); Б – FMRFa-ип окраска в нейронах, расположенных вокруг проксимальных отделов репродуктивной системы (маленькие стрелки). На (А) и (Б) отмечены нервные стволы (длинные стрелки) и нервные поперечные комиссуры (короткие стрелки), масштаб (на А, Б) 100 мкм.



**Рис. 2.** FMRFa-ип окрашивание нервной системы (зеленым) и мускулатуры TRITC-меченым фаллоидином (красным), в головном отделе тела *Dicrocoelium lanceatum* (CLSM, оптические срезы). А – FMRFa-ип нейроны (острия стрелок) посылают свои отростки (тонкие стрелки) к сумке цирруса (сц, длинная стрелка), отмечены: циррус (ци), нейроны (н) в составе нервных стволов (стрелки), ротовая присоска (рп) и глотка (гл), масштаб 120 мкм; Б – большее увеличение, другой оптический срез, FMRFa-ип нейроны (н), отсылающие отростки (тонкие стрелки) к дистальным отделам половой системы, нервные волокна стенки цирруса (ци), тонкие длинные стрелки, отмечен один из нейронов в стенке сумки цирруса (тупая стрелка), нервные стволы (нс), острия стрелок указывают на нейроны нервных стволов, масштаб 70 мкм.

**Обсуждение.** Полученные нами иммуноцитохимические результаты для трех видов трематод хорошо согласуются с имеющимися литературными данными для других видов. Так, GNFFRFa-ип нейроны обнаружены в репродуктивном тракте печеночной двуустки *Fasciola hepatica* и кровяных двуусток *Schistosoma mansoni* и *S. margrebowiei* [6]. FMRFa-ип нервные структуры локализуются вблизи структур репродуктивной системы у *Opisthorchis felineus* [7]. У моногеней *Diclidophora merlangi* обнаружены GYIRFa-ип нейроны в женской репродуктивной системе, которые иннервировали оотип, яйцеводы и резервуары желточников [8]. Нервные FMRFa-ип элементы выявлены в сумке цирруса у *Opisthio glyphe ranae* [9]. Сильная иннервация стенки оотипа GYIRFa-ип нервными элементами обнаружена у *Echinoparyphium caproni*. Авторы и пришли к выводу, что FMRF-подобные нейропептиды могут участвовать в процессе сборки яиц [10]. GYIRFa-ип иннервация отделов полового тракта самки была выявлена также у *Bucephaloides gracilescens* [11].

Известно, что различные отделы половой системы трематод содержат кольцевые и продольные мышечные волокна, наиболее развитые в терминальных отделах женской и мужской половой системы [12]. Наши и литературные данные показали наличие FMRFамид-позитивных нервных компонентов в разных отделах половой системы трематод. Это может свидетельствовать о важной роли FMRFамид-подобных нейропептидов в функционировании репродуктивной системы трематод. Влияние нейромедиаторов может осуществляться как путем регуляции мышечной активности репродуктивных протоков, так и путем их участия в процессах образования, развития и выделения яиц у паразитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Koziol U., Koziol M., Preza M. et al. // Int. J. Parasitol. 2016. 46(11). 709-21.
2. McVeigh P., Kimber M.J., Novozhilova E., Day T.A. // Parasitology. 2005. 131: 41-55.
3. Marks N.J., Maule A.G., Halton D.W. et al. // Parasitology. 1997. 114(6): 531-9.
4. Novozhilova E., Kimber M.J., Qian H. et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2010. 4(8): e790.
5. Гордеев И.И., Шевляков В.А., Курносов Д.С. и др. // Труды ВНИРО. 2019. 178: 200-5.
6. Marks N.J., Halton D.W., Maule A.G. et al. // Parasitology. 1995. 110: 371-81.
7. Tolstakov O.O., Terenina N.B., Serbina E.A., Gustafsson M.K.S. // Acta Parasitol. 2010. 55: 123-32.
8. Mair G., Maule A., Halton D. et al. // Parasitology. 1997. 114(5): 467-73.
9. Terenina N., Kreshchenko N., Chilyta N. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2015. 51(2): 145-51.
10. Šebelová S., Stewart M., Mousley A. et al. // Parasitol. Res. 2004. 93: 196-206.
11. Stewart M.T., Marks N.J., Halton D.W. // Parasitol. Res. 2003. 91: 12-21.
12. Halton D.W., Maule A.G. // Can. J. Zool. 2004. 82: 316-33.



# ВВЕДЕНИЕ НИФЕДИПИНА ВЛИЯЕТ НА РАЗВИТИЕ УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНЫХ МЫШЦ НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

*Львова И.Д., Шарло К.А., Сидоренко Д.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.*

ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия

**Введение.** Наблюдаемое в условиях космического полета, длительного постельного режима, иммобилизации при травмах состояние функциональной разгрузки сопровождается закономерными изменениями в функционировании постуральных скелетных мышц. В данных условиях происходит снижение экспрессии мРНК «медленной» окислительной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ) [1-3], последующее снижение окислительной способности мышц и повышение утомляемости. Также было показано, что уже после вторых и, как минимум, до 14-х суток функциональной разгрузки в миоплазме наблюдается повышенное содержание ионов кальция [4,5].

Избыточное накопление ионов кальция в миоплазме может приводить к нарушению функций митохондрий, активации митофагии [6], а также к повышенной утомляемости за счёт истощения депо саркоплазматического ретикулула [7]. Таким образом, мы решили проверить, как фармакологическое блокирование кальциевых каналов L-типа отразится на развитии утомляемости и экспрессии ряда параметров биогенеза митохондрий на фоне 7-суточной функциональной разгрузки.

**Материалы и методы.** Самцы крыс линии Wistar были случайным образом разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: С – виварный контроль, 7HS – 7-суточная функциональная разгрузка с ежедневным введением плацебо (физраствор, внутривентриально), 7HN – 7-суточная функциональная разгрузка с ежедневным введением нифедипина (внутривентриально, 7 мг/кг веса животного). Функциональную разгрузку моделировали с помощью антиортостатического вывешивания задних конечностей грызунов [8], животные имели постоянный доступ к корму и воде. После проведения эксперимента животным вводился бромэтанольный наркоз, выделялись камбаловидные мышцы из обеих ног, одна из которых немедленно замораживалась в жидком азоте и использована для выделения РНК и тотальной белковой фракции, а вторая подвергалась анализу утомляемости *ex vivo*. Все процедуры были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 629, от 06.12.2022 г).

**Результаты.** Мы обнаружили, что индекс утомления в группе 7HS достоверно снизился в сравнении с группой С, тогда как в группе 7HN оказался достоверно выше, чем в группе 7HS и не имел отличий от

контроля. Содержание регулятора биогенеза митохондрий PGC1 $\alpha$  в тотальной белковой фракции было достоверно снижено в группе 7HS в сравнении с группой С, при этом достоверных отличий между группами С и 7HN не обнаружено. Экспрессия мРНК PGC1 $\alpha$  была достоверно снижена в обеих экспериментальных группах в сравнении с группой С, и группы 7HS и 7HN не различались между собой. Также мы измерили экспрессию мРНК субъединицы I IV комплекса дыхательной цепи (COXI), и обнаружили, что в группе 7HS экспрессия достоверно снижена в сравнении с группой С, а в группе 7HN не отличалась от контроля. Экспрессия мРНК COXII и COXIV также была достоверно снижена в группе 7HS, тогда как в группе 7HN их экспрессия оказалась достоверно выше значений группы 7HS, хотя и достоверно ниже, чем в группе контроля. Экспрессия мРНК ядерного респираторного фактора NRF1 была достоверно снижена как в группе 7HS, так и в группе 7HN в сравнении с группой С, однако в группе 7HN также наблюдалось достоверное повышение экспрессии в сравнении с группой 7HS. Экспрессия мРНК изоформы тяжелых цепей миозина «медленного» типа MuHC I была достоверно снижена в обеих вывешенных группах в сравнении с контролем, и между этими двумя группами различий не было.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что блокирование кальциевых каналов L-типа на фоне 7-суточной функциональной разгрузки предотвращает накопление избыточного кальция в миоплазме, тем самым способствует предотвращению развития повышенной утомляемости, снижения содержания ключевого регулятора биогенеза митохондрий PGC1 $\alpha$ , снижения экспрессии ряда генов-регуляторов биогенеза митохондрий, однако не влияет на экспрессию мРНК «медленной» и «быстрой окислительной» изоформы ТЦМ.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 21-75-00063.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Martin T.P., Edgerton V.R., Grindeland R.E.* // J. Appl. Physiol. (1985). 1988. 65: 2318-25.
2. *Desplanches D., Mayet M.H., Ilyina-Kakueva E.I. et al.* // Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 1991. 63: 288-92.
3. *Stevens L., Sultan K.R., Peuker H. et al.* // Am. J. Physiol. 1999. 277: C1044-9.
4. *Andersson D.C., Betzenhauser M.J., Reiken S. et al.* // Cell Metab. 2011. 14: 196-207.
5. *Yu Z., Wang H., Tang W. et al.* // Cell Death Dis. 2021. 12: 632.
6. *Kravtsova V.V., Matchkov V.V., Bouzinova E.V. et al.* // Biomed. Res. Int. 2015. 2015: 720172.
7. *Krivoi I.I., Kravtsova V.V., Altaeva E.G. et al.* // Biofizika. 2008. 53: 1051-7.
8. *Morey-Holton E.R., Globus R.K.* // J. Appl. Physiol. (1985). 2002. 92: 1367-77.

ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНОВ СЕМЕЙСТВА HSP70 НА  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У  
*DROSOPHILA MELANOGASTER*

Махновский П.А.<sup>1</sup>, Кукушкина И.В.<sup>1,2</sup>, Вавилов Н.Э.<sup>3</sup>,  
Згода В.Г.<sup>3</sup>, Попов Д.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

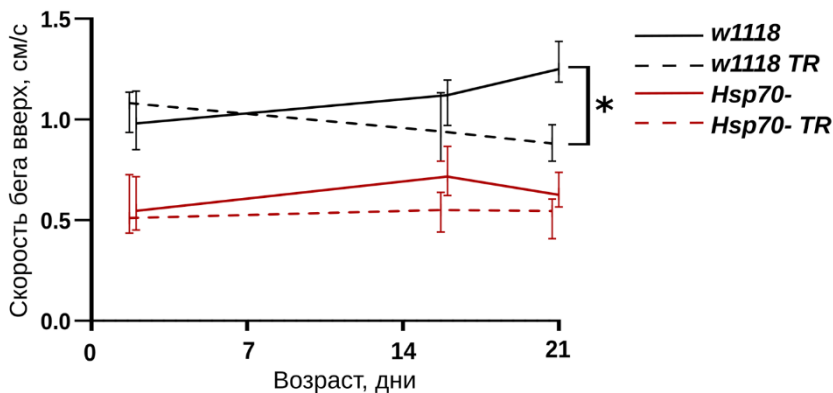
<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

**Введение.** Белки теплового шока являются ключевыми регуляторами протеостаза. Изменение экспрессии генов шаперонов семейства Hsp70 может влиять на физиологические и функциональные показатели скелетных мышц [1], а также определять патологические состояния, связанные с мышечной дистрофией [2]. Семейство генов *Hsp70* представлено множеством паралофов, имеющих сходные функции. Поэтому для оценки влияния белков семейств Hsp70 на функциональные возможности скелетных мышц мы использовали линию *D. melanogaster* с нокаутом 6 генов семейства *Hsp70* [3]. Цель работы – исследовать роль шаперонов семейства Hsp70 на фенотип скелетных мышц.

**Методы.** В работе использовалась линия мух *Drosophila melanogaster* (*Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B*) (далее *Hsp70-*) с нокаутом шести генов из семейства *Hsp70* (*Hsp70Aa, Hsp70Ab, Hsp70Ba, Hsp70Bb, Hsp70Bbb, Hsp70Bc*) и контрольная родительская линия *w<sup>1118</sup>*. Локомоторную активность оценивали по скорости геотаксис-индуцированного бега по вертикали с помощью специализированной программы для обработки видео FreeClimber [4]. Для изучения способности адаптироваться к хронически повышенной двигательной активности, прибор в заданное время суток вращал пробирки с мухами каждые 15 с на 180 град. вокруг поперечной оси, режим тренировочных сессий составлял 1.5 часа в день, 5 дней в неделю, общая длительность ежедневных тренировок составляла 20 дней. С помощью РНК-секвенирования и количественного панорамного масс-спектрометрического протеомного анализа, оценивали экспрессию генов в ногах мух, состоящих преимущественно из скелетных мышц. Библиотеки приготовлены из проб РНК с использованием набора NEBNext Ultra II RNA (New England Biolabs, США) и секвенированы на приборе NextSeq 550 (Illumina, США) с длиной прочтения 75 п.н. при глубине прочтения ~25 млн прочтений/образец. Прочтения картировали на геном *bdgp6.32* с помощью программы Hisat2. Для анализа

дифференциальной экспрессии генов использовали метод DESeq2 ( $\text{padj} < 0.05$ , изменение экспрессии  $> 1.25$  раз). Анализ функционального обогащения для биологических процессов, клеточных компонентов и сигнальных путей (базы данных GO BP DIRECT, GO CC DIRECT и KEGG PATHWAY) с помощью инструмента DAVID 6.8 ( $\text{Padj} < 0,01$ , точный тест Фишера с поправкой Бенджамини). Для оценки потенциальных регуляторов генной экспрессии проводили поиск обогащенных сайтов связывания в промоторах ДЭГ (дифференциально экспрессируемых генов) с помощью метода позиционных весовых матриц на платформе GeneXplain (функция «Search for enriched TFBSs (tracks)).

**Результаты.** Оценка работоспособности выявила, что скорость бега мух *Hsp70*- по вертикали была в 2 раза ниже, чем у мух контрольной линии *w1118*. При этом регулярные тренировки увеличили скорость бега по вертикали у мух контрольной линии относительно нетренированного контроля, но не оказали влияния на скорость бега у линии *Hsp70*- (рис. 1).



**Рис. 1.** Скорость бега вверх самцов линий *w1118* и *Hsp70*- у контрольных (сплошная линия) и тренирующихся (пунктирная линия) особей. \* – значимые отличия скорости бега ( $p\text{-value} < 0.05$ ).

Оценка транскриптома ног показала значительные различия между линиями – 1450 генов значительно различались по уровню экспрессии. Функциональный анализ показал, что у линии *Hsp70*- снижение экспрессии (775 генов) ассоциировано с генами, вовлеченными в разнообразные метаболические функции и сигнальные пути (пентозофосфатный путь, гликолиз, метаболизм аминокислот и др.) (табл. 1), в то время, как 675 генов с повышенной относительно контроля экспрессией были ассоциированы с функциями врожденного иммунитета, NFκB-сигнальными путями, внеклеточными гуморальными факторами в основном представленными антимикробными пептидами (табл. 2).

Анализ промоторов ДЭГ выявил обогащенные сайты (мотивы связывания) факторов транскрипции, потенциально ответственных за различия в генной экспрессии в тканях ног между линиями: увеличение экспрессии у линии *Hsp70*- было связано с активностью транскрипционных факторов семейства GATA (*srp*, *pnr*, *grn*, GATAe) и NFkB (*Dif*, *Rel*), промоторы генов с пониженной экспрессией оказались наиболее обогащены сайтами связывания с эстрогеноподобным рецептором ERR.

**Табл. 1.** Функциональное обогащение ДЭГ с пониженной экспрессией у *Hsp70*- в тканях ног.

	BP/CC DIRECT GO TERM, KEGG PATHWAY	Padj
METABOLIC PATHWAYS	Metabolic pathways	3.33E-11
CARBOHYDRATE METABOLISM	Pentose and glucuronate interconversions	5.16E-08
	Carbon metabolism	7.05E-08
	Pentose phosphate pathway	1.83E-04
	Glycolysis / Gluconeogenesis	9.95E-04
PEROXISOME	peroxisome	6.97E-08
	Peroxisome (KEGG)	1.24E-06
AMINO ACID METABOLISM	Biosynthesis of amino acids	1.77E-03
	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4.73E-03
	Arginine biosynthesis	8.29E-03
	Tyrosine metabolism	8.29E-03
RETINOL METABOLISM	Retinol metabolism	8.29E-03
MEMBRANE COMPONENT	integral component of membrane	5.52E-06
	extracellular region	6.27E-04
	transmembrane transport	2.39E-03
DRUG METABOLISM	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.77E-03

**Табл. 2.** Функциональное обогащение ДЭГ с повышенной экспрессией у *Hsp70*- в тканях ног.

	BP/CC DIRECT GO TERM, KEGG	Padj
INNATE IMMUNE RESPONSE	Toll and Imd signaling pathway	8.29E-09
	defense response to Gram-positive bacterium	8.76E-09
	antibacterial humoral response	3.84E-08
	defense response	5.87E-08
	response to bacterium	9.18E-08
	innate immune response	2.45E-06
	humoral immune response	7.86E-06
	response to wounding	3.91E-03
	defense response to insect	6.26E-03
	defense response to Gram-negative bacterium	6.26E-03
SENSORY PERCEPTION	sensory perception of chemical stimulus	9.09E-05
	detection of pheromone	9.36E-03
CUTICLE DEVELOPMENT	chitin-based cuticle development	6.26E-03
EXTRACELLULAR REGION	extracellular region	1.60E-23
	extracellular space	3.99E-09
DRUG METABOLISM	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3.50E-03
	Drug metabolism - cytochrome P450	3.50E-03
	Drug metabolism - other enzymes	2.01E-02
	Glutathione metabolism	2.10E-02

**Заклучение.** Нокаут генов шаперонов семейства *Hsp70* оказывает негативное влияние на функциональные возможности мышц у *D. melanogaster*, это выражается в значительно сниженной локомоторной активности и в отсутствии тренировочного эффекта. Такой фенотип ассоциирован со снижением экспрессии генов-регуляторов метаболизма жиров, углеводов и аминокислот в тканях скелетной мускулатуры. Помимо этого, нокаут *Hsp70* вызывает выраженное увеличение экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ, что вероятно связано с клеточным стрессом, индуцированным нарушением в фолдинге белков. По-видимому, в основе изменений генной экспрессии в скелетных мышцах мух линии *Hsp70*- лежит снижение активности

транскрипционных факторов-регуляторов метаболизма (например, ERR), и активации NFKB-сигнальных путей.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00405.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Smuder A.J., Morton A.B., Hall S.E. et al. // J. Cachexia Sarcopenia Muscle. 2019. 10(4): 767-81.
2. Gehrig S.M., van der Poel C., Sayer T.A. et al. // Nature. 2012. 484(7394): 394-8.
3. Gong W.J., Golic K.G. // Genetics. 2004. 168(3): 1467-76.
4. Spierer A.N., Yoon D., Zhu C.T. // J. Exp. Biol. 2021. 224(Pt2): jeb229377.

## СОДЕРЖАНИЕ РАКТ В КЛЕТКАХ C2C12 ПРИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ И ГИПЕРГЛИКЕМИИ

*Милованова К.Г., Дьякова Е.Ю., Черных А.Е., Капилевич Л.В.*

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

**Введение.** На сегодняшний день изучение молекулярных механизмов инсулинорезистентности и поиска новых способов их коррекции все еще остается актуальным, поскольку данные состояния оказывают глубокое влияние на качество и продолжительность жизни человека, во многом определяют здоровое старение и работоспособность пожилых людей [1]. Особый интерес представляют положительные эффекты физической активности, способствующие снижению резистентности к инсулину и восстановлению способности мышечных клеток утилизировать глюкозу [2]. Однако вопрос о том, как реализуется этот эффект, до сих пор является предметом дискуссий. Перспективным способом изучения данных вопросов являются эксперименты с клеточными культурами [3,4].

**Цель исследования:** исследовать влияние электрической стимуляции на содержание pAkt в клеточных культурах миотубул мышцы C2C12, культивируемых в условиях гипергликемии.

**Материалы и методы.** Работа выполнялась на клеточной культуре миобластов мышцы C2C12 (источник – коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург).

Культивировали клетки в среде с добавлением 5 мМ глюкозы в шестилучных планшетах, через три-пять дней после посева, когда клетки достигали 70–80% конфлюэнтности, они подвергались дифференцировке в среде, содержащей 5 мМ глюкозы. После окончания

дифференцировки планшеты с клетками случайным образом разделялись на две группы – экспериментальную (ЭГ, 48 лунок) и контрольную (КГ, 48 лунок). В планшетах ЭГ заменяли дифференцировочную среду с 5 мМ глюкозы на среду, содержащую 25 мМ. глюкозы.

Далее клетки подвергались электростимуляции (в качестве моделирования физической нагрузки). Для того, чтобы привести все клетки к состоянию базальной активности, в каждой группе проводили метод *serum starvation* – сывороточное голодание [5].

Затем каждая группа разделялась на 4 подгруппы. Первая оставалась интактной, а 2, 3 и 4 подвергались электростимуляции в течение 2, 6 и 24 часов соответственно. Сразу после завершения электростимуляции в 6 лунок в каждой подгруппе добавляли 10 нм инсулина, а в 6 лунок – сыворотку.

Клеточные лизаты получали солиubilизацией клеточных преципитатов в 1x PBS (pH 7.4) и циклами замораживания и оттаивания. Концентрация белка определялась с помощью метода Бредфорд.

Определение содержания фосфорилированной формы протеинкиназы АкТ выполнялось методом вестерн-блот с применением специфических антител anti-pAkt (ser427).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистического анализа STATISTICA 8.0.

**Табл. 1.** Содержание pAkt в образцах гомогенизированных миотубул после воздействия электростимуляции, Ме (Q1:Q3).

Стимуляция	Предобработка	Группы	
		Контрольная	Экспериментальная
Без стимуляции	Интактные	261 (229:295)	155 (127:179)*
	Инсулин	1512 (1458:1577)#	692 (655:738)*#
2 часа	Интактные	499 (462:439)	611 (668:741)*
	Инсулин	1855 (1764:1929)#	1452 (1399:1507)*#
6 часов	Интактные	611 (571:559)	799 (755:8420)*
	Инсулин	2145 (2033:2227)#	2120 (2048:2204)#
24 часа	Интактные	428 (381:484)	497 (448:562)
	Инсулин	1045 (989:1112)#	981 (931:1039)#

**Примечание:** \* – достоверность различий между экспериментальной и контрольной группой,  $p < 0.05$ . # – достоверность различий между интактными клетками и клетками, стимулированными инсулином,  $p < 0.05$ .



**Результаты.** Полученные результаты представлены в табл. 1. Белок pAkt обнаруживался во всех исследуемых образцах. В экспериментальной группе его содержание было ниже, чем в контрольной. Добавление инсулина приводило к достоверному увеличению содержания pAkt в обеих группах, однако в контрольной группе прирост был выше, чем в экспериментальной. Очевидно, что в данной модели инсулинорезистентность формируется лишь частично.

Культивирование миотубул C2C12 в среде с избытком глюкозы сопровождалось снижением содержания pAkt, а импульсная электростимуляция в течение 2–6 ч способствовала повышенному содержанию данного фермента и восстановлению чувствительности путей его фосфорилирования к воздействию инсулина.

**Заключение.** Полученные данные позволяют предположить о том, что сократительная функция мышечных клеток способствует восстановлению чувствительности к инсулину и поглощению глюкозы с использованием тех же путей регуляции и транспорта, которые влияют на развитие диабета 2 типа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 19-15-00118, <https://rscf.ru/project/19-15-00118/>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cloete L. // Nurs Stand. 2022. 37(1): 61-6.
2. Gabriel B.M., Zierath J.R. // 2017. 25(5): 1000-11.
3. Luo W., Ai L., Wang B.F., Zhou Y. // Biomed. Pharmacother. 2019. 120: 109498.
4. Zhang L., Wang J., Zhao Y.T. et al. // Front. Pharmacol. 2021. 12: 698714.
5. Pirkmajer S., Chibalin A.V. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2011. 301(2): C272-9.

## РОЛЬ КАНАЛОВ PIEZO1 В ПРОВЕДЕНИИ МЕХАНИЧЕСКОГО СИГНАЛА К mTORC1-ЗАВИСИМОМУ СИГНАЛЬНОМУ ПУТИ В ИЗОЛИРОВАННОЙ М. SOLEUS КРЫСЫ

*Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Сергеева К.В.,  
Калашников В.Е., Шенкман Б.С.*

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

**Введение.** Волокна скелетных мышц, выполняющие большой объём механической работы, снабжены различными механосенсорными структурами, которые участвует в восприятии механических возмущений с последующим их преобразованием во внутриклеточные биохимические процессы, регулирующие, в частности, синтез белка (анаболическая

механотрансдукция). Важнейшими сарколеммальными механосенсорами мышечного волокна являются механо-активируемые (МА) ионные каналы. В 2010 году было установлено, что трансмембранные белки семейства Piezo (Piezo1 и Piezo2) составляют молекулярную основу таких каналов [1]. Белки Piezo1 и Piezo2 экспрессируются в различных тканях млекопитающих, при этом в мышечной ткани было обнаружено наличие каналов Piezo1 [2,3]. Регуляция синтеза мышечных белков в ответ на механические стимулы (или их отсутствие) во многом определяет мышечную пластичность. Одним из ключевых внутриклеточных путей, регулирующих синтез белка, является mTORC1 (мишень рапамицина у млекопитающих, комплекс 1)-зависимый сигнальный путь. Активность mTORC1 обычно оценивают по фосфорилированию его основных субстратов – рибосомальной киназы p70 (p70S6K) и белку, связывающему фактор инициации трансляции 4E (4E-BP1). Однако роль каналов Piezo1 в регуляции анаболической сигнализации в скелетных мышцах является неисследованной. Цель работы состояла в исследовании потенциальной роли механо-активируемых каналов Piezo1 в активации анаболического mTORC1-зависимого пути в изолированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы в ответ на механическую нагрузку.

**Материалы и методы.** В исследовании использовались самцы крыс Wistar массой  $190 \pm 10$  г. Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Животные были разделены на 3 группы (по 7 животных в каждой группе): 1) группа без добавления ингибитора или активатора механо-активируемых каналов в раствор с изолированной мышцей (Control), 2) группа животных с добавлением хлорида гадолиния (ингибитор механо-активируемых каналов) в раствор с изолированной мышцей (Gadolinium) и 3) группа с добавлением активатора каналов Piezo1 в раствор с изолированной мышцей (Yoda). В качестве активатора каналов Piezo1 использовался препарат Yoda1 (Tocris Bioscience, CAS 448947-81-7) с конечной концентрацией в растворе 10 микромоль. Конечная концентрация гадолиния составляла также 10 микромоль. Под изофлурановым наркозом у животных извлекались левая и правая камбаловидные мышцы (*m. soleus*) для последующей механической нагрузки мышц с помощью циклов растяжения/укорочения *ex vivo*. В каждой группе мышца из левой конечности оставалась в соответствующем растворе Рингера-Кребса (Resting), а мышца из правой конечности подвергалась механической нагрузке (Stretch) согласно протоколу, изложенному в [4]. Yoda1 и хлорид гадолиния добавлялись в растворы с обеими мышцами соответствующей группы. Фосфорилирование мишеней mTORC1 в *m. soleus* крысы определяли с помощью стандартной методики иммуноблоттинга. Программа эксперимента и все манипуляции с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 632 от 18.01.2023 г.).

**Результаты и обсуждение.** Через час после окончания серии растяжений, в изолированной *m. soleus* крысы наблюдалось достоверное увеличение фосфорилирования киназы p70S6 и её субстрата, рибосомального белка S6 (rpS6), а также 4E-BP1 на 38.5%, 168% и 112%, соответственно, по сравнению с интактной мышцей, которая не подвергалась механическому воздействию. Полученные данные хорошо согласуются с ранее опубликованными работами, в которых исследовалось влияние эксцентрических сокращений на активацию анаболической сигнализации в скелетных мышцах [5,6]. Инкубация изолированных мышц в растворе с хлоридом гадолиния полностью предотвратила вызванную серией растяжений активацию (активирующее фосфорилирование) маркеров mTORC1-зависимого пути. Такого рода снижение фосфорилирования мишеней mTORC1 в скелетной мышце крысы в ответ на эксцентрическую нагрузку ранее было отмечено после воздействия гадолиния, стрептомицина [6], а также в атрофированной мышце [7]. Инкубация *m. soleus* в растворе со специфическим активатором каналов Piezo1 после серии растяжений привела к снижению механо-зависимого фосфорилирования p70S6K, rpS6 и 4E-BP1 по сравнению с контрольной мышцей (т.е. без инкубации с активатором каналов Piezo1). Причины наблюдаемого эффекта от применения активатора каналов Piezo1 требует дальнейших исследований.

**Заключение.** Инкубация изолированных камбаловидных мышц крысы в растворе с ингибитором механо-активируемых каналов (гадолинием) и активатором канала Piezo1 (Yoda1) после серии механических воздействий в виде мышечных растяжений привела к снижению механо-зависимой активации mTORC1-зависимого сигнального пути. При применяемом в настоящем исследовании виде механического воздействия каналы Piezo1, по-видимому, не участвуют в проведении механического сигнала к сигнальному пути mTORC1/p70S6K в изолированной *m. soleus* крысы. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-10046).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Coste B., Mathur J., Schmidt M. et al. // Science. 2010. 330(6000): 55-60.
2. Tsuchiya M., Hara Y., Okuda M. et al. // Nat. Commun. 2018. 9(1): 2049.
3. Bosutti A., Giniatullin A., Odnoshivkina Y. et al. // Acta Physiol. (Oxf). 2021. 233(4): e13702.
4. Rindom E., Kristensen A.M., Overgaard K. et al. // Acta Physiol. (Oxf). 2019. 227(3):e13336.
5. O'Neil T.K., Duffy L.R., Frey J.W., Hornberger T.A. // J. Physiol. 2009. 587(Pt 14): 3691-701.
6. Spangenburg E.E., McBride T.A. // J. Appl. Physiol. 2006. 100(1): 129-35.
7. Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. // Int. J. Mol. Sci. 2019. 20(5): 1165.

# РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ

*Сорокина Д.М., Шайдуллов И.Ф., Ситдииков Ф.Г., Ситдикова Г.Ф.*

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

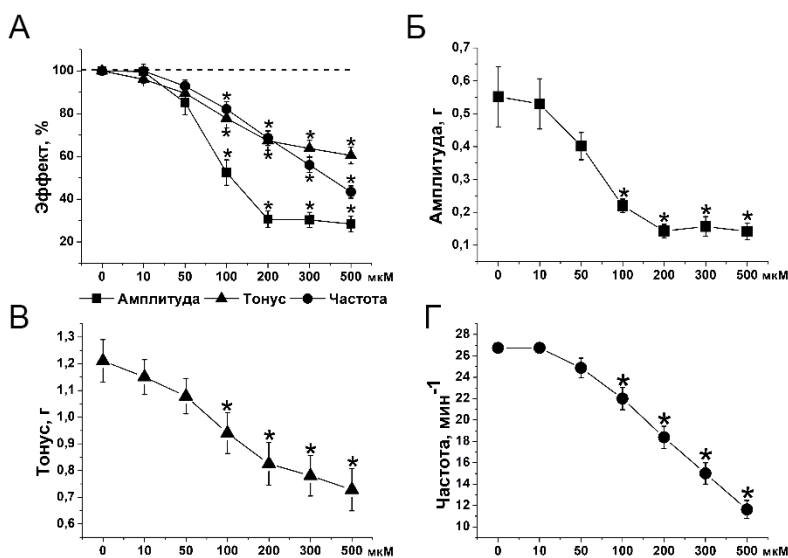
**Введение.** Сероводород ( $H_2S$ ) является газообразным посредником, наряду с оксидом азота и монооксидом углерода, влияющим на различные функции организма в физиологических и патологических условиях [1-4].  $H_2S$  эндогенно синтезируется ферментами цистатионин- $\beta$ -синтаза (CBS), цистатионин- $\gamma$ -лиаза (CSE) и 3-меркаптопируват сульфуртрансферазой (3-MPST) [2-5]. В желудочно-кишечном тракте экспрессия CBS, CSE и 3-MPST была обнаружена в различных типах клеток [3,6]. Показано что  $H_2S$  в высоких концентрациях ингибирал спонтанные сокращения, тогда как более низкие концентрации  $H_2S$  усиливали моторику кишечника [5,7,8].

Известно, что широко распространенными мишенями  $H_2S$  в гладкомышечных клетках являются калиевые каналы различных типов. При высоких концентрациях  $H_2S$  подавлял амплитуду спонтанного сокращения за счет открытия  $K_{ATP}$ -каналов, а при низких концентрациях увеличивал тоническое напряжение, за счет ингибирования потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов [9,10]. Было показано, что возбуждающий эффект  $H_2S$  подавлялся 4-AP, ингибитором потенциал-зависимых калиевых каналов [9,11], в то время как ингибирующий эффект был опосредован активацией  $K_{ATP}$ -каналов [9-13]. В подвздошной кишке морской свинки и крысы  $K_{ATP}$ -каналы не принимали участия в расслабляющем влиянии  $H_2S$  [14].

В целом эти данные свидетельствуют о том, что роль калиевых каналов в эффектах  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте неоднозначны и зависит от локализации этих каналов. Таким образом, целью нашего исследования было выявление роли калиевых каналов в эффектах сероводорода на сократительную активность тощей кишки крысы.

**Методика исследований.** Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (86/609/ЕЕС) и одобрены локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015; протокол № 33 от 25.11.2021). Для регистрации сокращений были использованы сегменты кишки длиной 5-7 мм, в изометрических условиях на установке фирмы BiopacSystems (США). В экспериментах использовался раствор Кребса ( $mM \cdot l^{-1}$ ): NaCl 121.0; KCl 5.9;  $CaCl_2$  2.5;  $MgCl_2$  1.2;  $NaHCO_3$  25.0;  $NaH_2PO_4$  1.2; glucose 8.0 (pH 7.2-7.4);  $t = 37^\circ C$ . Раствор постоянно аэрировался смесью  $O_2$  95% и  $CO_2$  5% (карбоген). После закрепления препарата добивались стабилизации сокращений в течение 40-60 минут.

В качестве донора  $H_2S$  использовали гидросульфид натрия ( $NaHS$ ) в концентрации 200 мкМ. В экспериментах также использовали: неселективный блокатор  $K^+$ -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА, 10 мМ), блокатор потенциал-зависимых  $K^+$ -каналов 4-аминопиридин (4-АП, 200 мкМ), блокатор  $K^+$ -каналов внутреннего выпрямления хлорид бария (30 мкМ), блокатор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид (50 мкМ) и активатор  $K_{ATP}$ -каналов диазоксид (100 мкМ). Анализировали амплитуду, тоническое напряжение и частоту спонтанных сокращений препарата. Параметры сократительной активности в контроле принимали за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка средней,  $n$  указывает на количество препаратов. Значения  $p < 0.05$  считались статистически значимыми.



**Рис. 1.** Влияние  $NaHS$  на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы. (А) Изменение амплитуды (квадрат), тонуса (треугольник) и частоты (кружок) спонтанной сократительной активности при кумулятивной аппликации  $NaHS$  в концентрациях 10, 50, 100, 200, 300 и 500 мкМ. Влияние кумулятивного добавления  $NaHS$  на амплитуду (Б), тонус (В) и частоту (Г) спонтанной сократительной активности тощей кишки крысы в концентрациях 10, 50, 100, 200, 300 и 500 мкМ. Контрольные значения были приняты за 100%; \*  $p < 0.05$ .

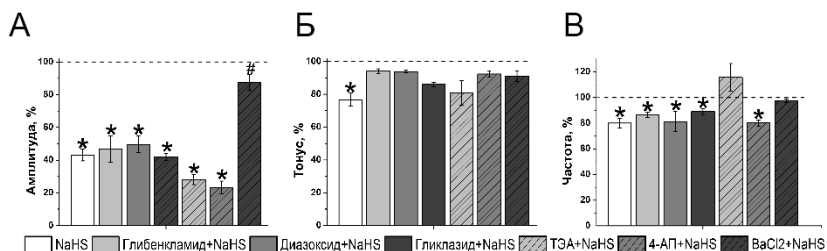
**Результаты.** Для выявления роли  $H_2S$  в спонтанной двигательной активности тощей кишки крысы добавляли  $NaHS$  кумулятивно в концентрациях от 10 до 500 мкМ. Добавление донора  $H_2S$  в концентрациях 10 и 50 мкМ не приводило к изменению параметров спонтанных

сокращений, в концентрациях от 100 до 500 мкМ – достоверно снижало тоническое напряжение, амплитуду и частоту спонтанных сокращений (рис. 1). В дальнейших экспериментах использовали NaHS в концентрации 200 мкМ, которая к десятой минуте приводила к снижению частоты до 80% ( $n = 19$ ;  $p < 0.05$ ), амплитуды до 43% ( $n = 19$ ;  $p < 0.05$ ), тонического напряжения до 76% ( $n = 19$ ;  $p < 0.05$ ) относительно контроля.

Для выявления вклада  $K_{ATФ}$ -каналов в эффектах NaHS использовали блокатор  $K_{ATФ}$ -каналов глибенкламид в концентрации 50 мкМ, который приводил к снижению амплитуды спонтанных сокращений ( $n = 24$ ;  $p < 0.05$ ), частота и тоническое напряжение при этом не менялись ( $n = 24$ ;  $p > 0.05$ ). На фоне действия глибенкламида эффект NaHS на амплитуду ( $n = 12$ ;  $p < 0.05$ ) и на частоту спонтанных сокращений ( $n = 12$ ;  $p < 0.05$ ) сохранялся, а на тоническое напряжение не проявлялся ( $n = 12$ ;  $p > 0.05$ ) (рис. 2). Активатор  $K_{ATФ}$ -каналов диазоксид в концентрации 100 мкМ приводил к снижению амплитуды ( $n = 22$ ;  $p < 0.05$ ) и частоты спонтанных сокращений ( $n = 27$ ;  $p < 0.05$ ), тонус при этом не изменялся ( $n = 28$ ;  $p > 0.05$ ). На фоне действия диазоксида эффект NaHS на амплитуду ( $n = 9$ ;  $p < 0.05$ ) и частоту ( $n = 4$ ;  $p < 0.05$ ) сокращений сохранялся, а ингибирующее влияние NaHS на тоническое напряжение не проявлялось ( $n = 16$ ;  $p > 0.05$ ) (рис. 2). Сходные эффекты оказывал другой активатор  $K_{ATФ}$ -каналов гликлазид в концентрации 1 мкМ. Добавление гликлазида не приводило к изменению амплитуды, тонуса и частоты спонтанных сокращений ( $n = 8$ ;  $p > 0.05$ ). На фоне гликлазида эффект NaHS на амплитуду ( $n = 8$ ;  $p < 0.05$ ) и частоту ( $n = 8$ ;  $p < 0.05$ ) сохранялся, а на тоническое напряжение не проявлялся ( $n = 8$ ;  $p > 0.05$ ) (рис. 2).

Неселективный блокатор  $K^+$ -каналов ТЭА в концентрации 10 мМ вызывал повышение амплитуды сокращений ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) и тонического напряжения ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контроля, при этом частота сокращений достоверно не изменялась ( $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ). Повышение амплитуды сокращений при ингибировании  $K^+$ -каналов связано с увеличением длительности реполяризации потенциалов действия гладкомышечных клеток и усилением входа ионов  $Ca^{2+}$ , запускающих процесс сокращения. В условиях блокирования  $K^+$ -каналов ТЭА, ингибирующий эффект NaHS на амплитуду ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) и тоническое напряжение ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) сохранялся, при этом на частоту спонтанных сокращений не проявлялся ( $n = 7$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2).

Блокатор потенциал зависимых  $K^+$ -каналов 4-АП в концентрации 200 мкМ приводил к повышению амплитуды ( $n = 9$ ,  $p < 0.05$ ) относительно контроля, при этом частота сокращений и тоническое напряжение не изменялись. На фоне 4-АП эффект NaHS на амплитуду ( $n = 9$ ,  $p < 0.05$ ) и на частоту сохранялся ( $n = 9$ ,  $p < 0.05$ ), а на тоническое напряжение не проявлялся ( $n = 9$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2).



**Рис. 2.** Роль калиевых каналов в эффектах NaHS на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы. Влияние глибенкламида, диазоксид, гликлазида, ТЭА, 4-АП, хлорида бария в эффектах донора сероводорода на амплитуду (А), тонус (Б) и частоту (В) спонтанных сокращений. Значения контроля были приняты за 100% – показана пунктирной линией; \*  $p < 0.05$  – относительно контроля, # – по отношению к NaHS в контроле.

Добавление блокатора калиевых каналов внутреннего выпрямления хлорида бария в концентрации 30 мкМ не оказывало влияние на параметры спонтанных сокращений ( $n = 19$ ,  $p > 0.05$ ). Однако на фоне хлорида бария эффект NaHS на амплитуду был выражен в меньшей степени, чем в контроле ( $n = 13$ ,  $p < 0.05$ ), а на тоническое напряжение ( $n = 13$ ,  $p < 0.05$ ) и на частоту не проявлялся ( $n = 13$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2).

**Обсуждение.** Роль  $H_2S$  в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта может различаться в зависимости от физиологических особенностей исследуемого отдела [7,14-15].  $H_2S$  может подавлять спонтанную и вызванные ацетилхолином сократительную активность тонкого и толстого кишечника у мышей, крыс и морских свинок [7,14,16]. В нашем исследовании донор  $H_2S$  вызывал расслабление препарата тощей кишки крысы, снижая спонтанную активность, что согласуется с ранее полученными данными [8,15].

Важную роль в регуляции двигательной активности ЖКТ выполняют калиевые каналы, они формируют мембранный потенциал покоя, влияют на генерацию медленных волн деполяризации и форму потенциала действия [17].  $K_{ATP}$ -каналы являются одной из мишеней действия  $H_2S$  во многих тканях [9]. Прямое ингибирующее действие NaHS на гладкие мышцы в значительной степени опосредовано действием на  $K_{ATP}$ -каналы [18]. Исследования Teague et al. (2002) в подвздошной кишке кролика и морской свинки продемонстрировали, что NaHS вызывал ингибирование сокращения мышц, стимулированного ацетилхолином, и этот эффект не зависел от активации  $K_{ATP}$ -канала, поскольку глибенкламид не влиял на индуцированное NaHS снижение сокращения мышц [14]. В нашем исследовании диазоксид привел к понижению амплитуды и частоты спонтанных сокращений. Активация  $K_{ATP}$ -каналов диазоксидом и гликлазидом предотвращала угнетающий эффект  $H_2S$  на

тоническое напряжение. Глибенкламид привел к снижению амплитуды спонтанных сокращений, также ингибитор  $K_{ATФ}$ -каналов снимал эффект  $H_2S$  на тонус. По-видимому, в гладкомышечных клетках тощей кишки крысы присутствуют функциональные  $K_{ATФ}$ -каналы, активация которых  $H_2S$  вызывает гиперполяризацию и расслабление. Роль данных типов каналов также подтверждают и исследования механизмов действия  $NaHS$  в тонком и толстом кишечнике, где апамин и глибенкламид частично снимали эффекты  $NaHS$  [15].

Имеются данные, что в желудке морской свинки и антральном отделе желудка мыши  $H_2S$  в низких концентрациях усиливал тонус и амплитуду сокращений [10], тогда как ТЭА и 4-АП подавляли этот эффект [9, 12]. Эффект  $NaHS$  не проявлялся на фоне ТЭА – неселективного блокатора калиевых каналов, и 4-АП – блокатора потенциал зависимых  $K^+$ -каналов [17]. Добавление хлорида бария и 4-АП могут играть роль в расслаблении гладкой мускулатуры [18]. Результаты нашего исследования показали, что ТЭА и 4-АП приводили к повышению амплитуды сокращений. Повышение амплитуды сокращений при ингибировании  $K^+$ -каналов связано с увеличением длительности потенциала действия гладкомышечных клеток и усилением входа ионов  $Ca^{2+}$ , запускающих процесс сокращения [17]. В этих условиях угнетающий эффект  $H_2S$  на параметры спонтанных сокращений сохранились. Хлорид бария значительно усилил амплитуду сократительной активности изолированных гладких мышц тонкой кишки кроликов [18]. В наших экспериментах блокатор калиевых каналов внутреннего выпрямления хлорид бария не оказывал влияния на параметры спонтанных сокращений. Однако на фоне хлорида бария эффект  $NaHS$  на амплитуду был выражен в меньшей степени.

**Закключение.** Таким образом, эффекты  $H_2S$  на тоническое напряжение препарата тощей кишки опосредованы активацией АТФ-зависимых  $K$ -каналов. А ингибирующие эффекты  $H_2S$  на тонус, амплитуду и частоту спонтанных сокращений препарата связаны с активацией калиевых каналов внутреннего выпрямления. При этом роль этих каналов в эффектах сероводорода на амплитуду сокращений были выражены в меньшей степени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sitdikova G.F., Fuchs R., Kainz V. et al. // Front. Physiol.* 2014. 5(Nov): 431.
2. *Linden D.R. // Antioxid. Redox. Signal.* 2014. 20(5): 818-30.
3. *Farrugia G., Szurszewski J.H. // Gastroenterology.* 2014. 147(2): 303-13.
4. *Cirino G., Szabo C., Papapetropoulos A. // Physiol. Rev.* 2023. 103(1): 31-276.
5. *Jimenez M., Gil V., Martinez-Cutillas M. et al. // Br. J. Pharmacol.* 2017. 174(17): 2805-17.
6. *Martin G.R., McKnight G.W., Dickey M.S. et al. // Dig. Liver. Dis.* 2010. 42(2): 103-9.
7. *Nagao M., Duenes J.A., Sarr M.G. // J. Gastrointest. Surg.* 2012. 16(2): 334-43.



8. *Gabitova D.M., Shaidullov I.F., Sabirullina G.I. et al. // Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. 163(1): 14-7.
9. *Zhao P., Huang X., Wang Z.Y. et al. // Eur. J. Pharmacol.* 2009. 616(1-3): 223-8.
10. *Shaidullov I.F., Shafiqullin M.U., Gabitova L.M. et al. // J. Evol. Biochem. Phys.* 2018. 54: 400-7.
11. *Ali M.Y., Ping C.Y., Mok Y.Y.P. et al. // Br. J. Pharmacol.* 2006. 149(6): 625-34.
12. *Han Y.F., Huang X., Guo X. et al. // Eur. J. Pharmacol.* 2011. 673(1-3): 85-95.
13. *Huang X., Meng X.M., Liu D.H. et al. // Eur. J. Pharmacol.* 2013. 720(1-3): 276-85.
14. *Teague B., Asiedu S., Moore P.K. // Br. J. Pharmacol.* 2002. 137(2): 139-45.
15. *Vogalis F. // J. Auton. Pharmacol.* 2000. 20(4): 207-19.
16. *Tang G., Wu L., Wang R. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010. 37(7): 753-63.
17. *Murthy K.S. // Annu. Rev. Physiol.* 2006. 68: 345-74.
18. *Cheng Xiang G. // Genomics Appl. Biol.* 2017. 36(12): 4953-7.

## СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВЕ АЦЕДАНА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И КЛЕТКАХ

*Таржанов И.А.<sup>1,2</sup>, Шарипов Р.Р.<sup>3</sup>, Згодова А.А.<sup>1,2</sup>, Некрасова А.А.<sup>1</sup>,  
Бакаева З.В.<sup>1,4</sup>, Сурин А.М.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский Университет)», Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет  
им. Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия

**Введение.** Эндогенный сероводород ( $H_2S$ ) рассматривают в качестве третьего газа-трансммитера меж- и внутриклеточных сигналов наравне с оксидом азота и монооксидом углерода [1,2].  $H_2S$  может образовываться в различных клетках, тканях, органах двумя ферментами: цистатионин- $\beta$ -синтазой и цистатионин- $\gamma$ -лиазой. В клетках мозга и эпителия сосудов был обнаружен третий фермент 3-меркаптопируват сульфотрансфераза [2], который совместно с цистеин аминотрансферазой производит  $H_2S$  [3,4]. Нарушения сигнального пути  $H_2S$  проявляются при различных нейродегенеративных заболеваниях [5,6].

Для исследования роли  $H_2S$  во внутриклеточном сигналинге критично наличие флуоресцентного зонда, чувствительного к низким концентрациям  $H_2S$ , обладающего высокой яркостью, быстрым реагированием с  $H_2S$ , имеющего значительное смещение Стокса спектров возбуждения и эмиссии, и низкую фототоксичность.  $H_2S$  в организме существует преимущественно в форме аниона  $HS^-$  и поэтому желательно, чтобы флуоресцентный зонд чувствовал  $HS^-$ . Среди коммерчески доступных зондов можно отметить созданный на основе производных

ацедана и названный P3 [7]. В данной работе проверили пригодность P3 для регистрации изменений H<sub>2</sub>S в буферах, имитирующих минимальный солевой состав внутриклеточной среды и внеклеточного буфера, в водно-органическом растворе, а также в клетках первичной нейроглиальной культуры из коры головного мозга крысы.

**Методы. Измерения спектров флуоресценции P3 и кинетики образования из него карбоциклического соединения,** содержащего сульфгидрильную группу (csP3), проводили на планшетном ридере ClarioStar (BMG LABTECH GmbH, Germany).

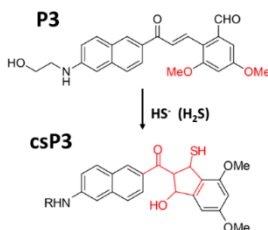
**Первичные нейрональные культуры получали** из коры головного мозга крыс Вистар (P1-P2) как описано в [10]. Эксперименты с животными проводили в соответствии с нормативными документами приказом Минздрава России № 199н от 04.01.2016. Все протоколы были одобрены комитетом по этике ФГБНУ «НИИОПП».

**Флуоресцентно-микроскопические измерения** в клеточных культурах выполнены на микроскопе Nikon Ti2 (Japan). Флуоресценцию возбуждали при 387 ± 6 нм, используя источник света рE-340Fura (CoolLED, UK). Эмиссию регистрировали с помощью sCMOS камеры (Teledyne Photometrics, США), используя светофильтры 483 ± 16 и 520 ± 18 нм. Регистрацию, хранение и первичную обработку изображений проводили, с помощью программы Nikon NIS-Elements (Japan).

Внеклеточный буфер состоял из (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 5 глюкозы; pH = 7.4. Зонд P3 приобретен у Sigma-Aldrich (США). Маточный раствор P3 (10 мМ) готовили в диметилсульфоксиде (DMSO). Солевой состав, соответствующий внутриклеточной среде (мМ): 130 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 HEPES, pH = 7.2 [8,9].

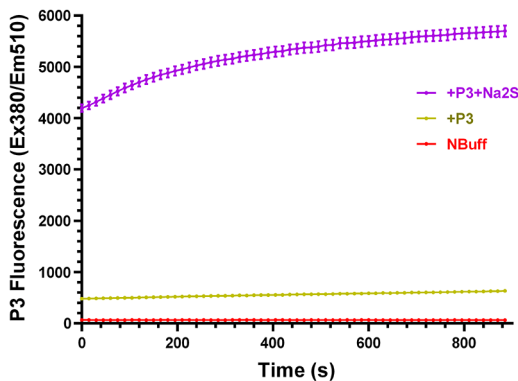
Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли, используя программы Microsoft Excel и Graph Pad Prism-8.

**Результаты. Флуоресценция P3 и csP3 в растворах.** Структурные формулы P3 и его производного, которое образуется в результате взаимодействия с HS<sup>-</sup> или H<sub>2</sub>S, показаны на рис. 1 [7].



**Рис. 1.** Структура слабо флуоресцирующего соединения P3 и сильно флуоресцирующего продукта его взаимодействия с H<sub>2</sub>S и анионом HS<sup>-</sup> в водном буфере, csP3 (заимствовано из [7]).

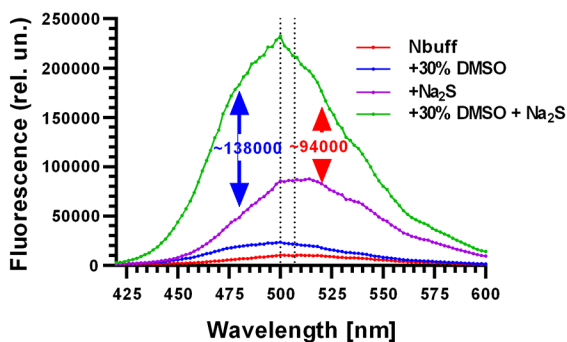
Сульфид натрия ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), благодаря гидролизу в водном растворе, служит стандартным донором  $\text{SH}^-/\text{H}_2\text{S}$  [7,11]. При комнатных условиях за время смешивания P3 с  $\text{Na}_2\text{S}$  и подготовки регистрации (~5 мин) успевало пройти около 70% реакции P3 с  $\text{SH}^-/\text{H}_2\text{S}$  (рис. 2), в согласии с данными [7].



**Рис. 2.** Изменения флуоресценции, вызванные добавкой сульфида натрия ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), служащего донором  $\text{H}_2\text{S}$ , к раствору P3. Состав буфера соответствует внеклеточному. Концентрации P3 и  $\text{Na}_2\text{S}$  соответственно 10 и 100 мкМ.

Замена солевого состава внеклеточного буфера на раствор, имитирующий минимальный внутриклеточный, привела к росту флуоресценции csP3 на 43%. Внутриклеточная среда содержит бикарбонат, образующийся в митохондриях в результате окислительного фосфорилирования, поэтому проверили влияние  $\text{NaHCO}_3$  на флуоресценцию csP3. Добавление бикарбоната до физиологической концентрации (10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ; [12]), дополнительно увеличивало флуоресценцию csP3 во внутриклеточном буфере на ~10%.

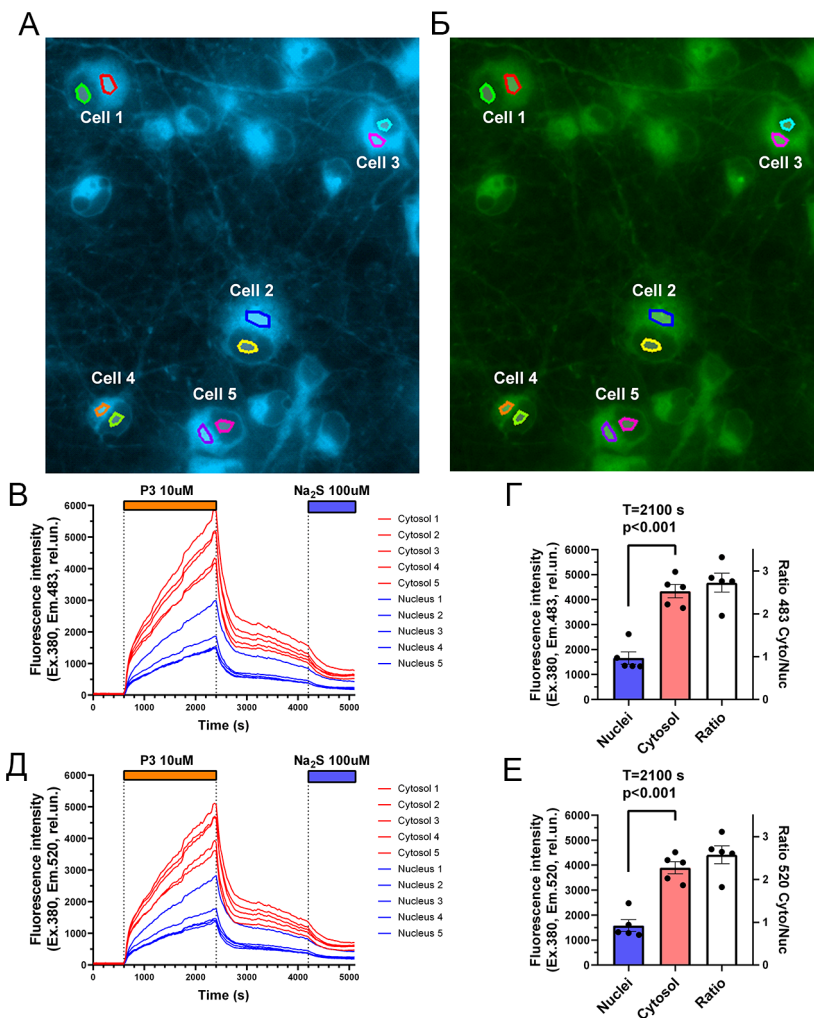
Химические структуры P3 и csP3 показывают наличие полярных групп и гидрофобных ароматических фрагментов (рис. 1) [7,13]. Это позволяет предположить, что флуоресценция P3 и csP3 (1) может быть чувствительной к солевому составу и (2) оба вещества могут перераспределяться между водным и менее полярным окружением (мембранами и белками). Перемещение молекулы в менее полярное окружение вызывает, как правило, коротковолновый сдвиг спектра и увеличение квантового выхода флуоресценции [14]. Добавив диметилсульфоксид (DMSO), мы убедились, что флуоресценция P3 и csP3 чувствительна к снижению полярности микроокружения (рис. 3).



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции исходного P3, его производного csP3. Спектры записаны через 20 мин после смешения P3 с Na<sub>2</sub>S. Концентрации реагентов и состав буфера как на рис. 2. Спектры P3+DMSO и csP3+DMSO получены после добавления DMSO (30% по объему)

*Флуоресцентная микроскопия.* На изображениях клеток первичной нейрональной культуры из мозга крысы, к которым добавили P3 (10 мкМ), видно, что флуоресценция распределена в основном в цитоплазме и значительно менее интенсивна в области ядра (рис. 4А, Б). Такое перераспределение зонда указывает на то, что внутриклеточные мембраны, заполняющие цитоплазму, связывают P3 лучше, чем нуклеоплазма, лишенная внутренних мембран.

Подъем флуоресценции после аппликации P3 (10 мкМ) имел нелинейный характер (рис. 4В, Д). Отмывание не связавшегося P3, останавливало рост сигнала. Для проверки полноты превращения P3 в csP3 делали дополнительную добавки Na<sub>2</sub>S (100 мкМ). Ускорения прироста флуоресценции не обнаружено (рис. 4В, Д), что показывает, что (1) весь P3 быстро превратился в csP3, либо (2) рост флуоресценции отражает не столько образование csP3 из P3, сколько диффузию P3 в зоны клетки меньшей полярности и, соответственно, снижение тушения его флуоресценции. Для проверки второго предположения мы весь P3 перед добавлением к клеткам превратили в csP3, предварительно проинкубировав P3 (10 мкМ) 30 мин с Na<sub>2</sub>S (300 мкМ). Затем выполнили измерения на сестринских культурах, к которым добавили P3 или csP3, полученный указанным способом. Совмещение амплитуд сигналов P3 и csP3 в клетках показало, что кинетика нарастания флуоресценции в обоих случаях одинаковая. Если бы P3 сначала превращался в csP3, а затем csP3 диффундировал в гидрофобные зоны клетки и увеличивал там флуоресценцию, то графики бы, вероятно, различались.



**Рис. 4.** Флуоресценция производного P3 в области ядра существенно ниже, чем в области цитозоля. (А, Б) Изображения нейронов при возбуждении на 387 нм и регистрации эмиссии на 483 нм (А) и 520 нм (Б). На изображениях выделены ROI, кинетика изменений интенсивности которых приведена на графиках (В, Д). Изменения в области ядра обозначены синим цветом, в области цитозоля – красным. На диаграммах (Г, Е) попарно сопоставлены интенсивности через 23 мин после добавления P3 и приведены величины отношения интенсивности в области цитозоля к интенсивности в области ядра (Ratio; правые шкалы на панелях Г и Е). Объектив 40×/NA = 1.35 oil.

**Обсуждение.** Основной находкой данной работы является то, что флуоресцентные характеристики P3 и продукта его взаимодействия с H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>, csP3, чувствительны к ионному составу буфера. Не менее важно обнаружение диффузии P3 и csP3 во внутриклеточные структуры, в которых флуорофорная часть зонда защищена от тушения полярным окружением (рис. 3, 4) [7,13]. Перераспределение P3 между водной и гидрофобной фазами может влиять на кинетику превращения P3 в csP3 и на флуоресцентные параметры обеих молекул. Создание чувствительных, специфичных и быстро реагирующих с H<sub>2</sub>S зондов продолжается [6,15]. Следует, однако учесть, что у всех этих сенсоров есть общее свойство – ароматическая часть, служащая флуорофором. Параметры флуоресценции таких зондов будут, как в случае P3 и csP3, отражать не только содержание H<sub>2</sub>S и HS<sup>-</sup>, но и перераспределение зондов между фазами клетки различной полярности.

Работа выполнена при поддержке средств Гос. задания № FGFU-2022-0012 и субсидии минобрнауки России № 08- 07-S6/2021/82930.

Авторы глубоко признательны И.А. Помыткину за предоставление зонда P3 и ценные советы при выполнении работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сукманский О.И., Реутов В.П. // Успехи Физиологических Наук. 2016. 47(3): 30-58.
2. Wang R. // Antioxid. Redox. Signal. 2010. 12. 1061-4.
3. Kimura H. // Br. J. Pharmacol. 2020. 177: 5031-45.
4. Zhong H., Yu H., Chen J. et al. // Front. Pharmacol. 2020. 11:702.
5. Salehpour M., Ashabi G., Kashef M. et al. // Exp. Aging Res. 2022. 18: 1-14.
6. Sun P., Chen H.C., Lu S. et al. // Anal. Chem. 2022. 94(33): 11573-81.
7. Singha S., Kim D., Moon H. et al. // Anal. Chem. 2014. 87(2): 1188-95.
8. Safiulina D., Kaasik A., Seppet E. et al. // J. Neurosci. Methods. 2004 137(1): 87-95.
9. Kolikova J., Afzalov R., Surin A. et al. // Cell Calcium. 2011. 50(6): 491-501.
10. Krasilnikova I., Surin A., Fisenko A. et al. // Front. Neurosci. 2017. 13: 1027.
11. Yoo D., Jupiter R.C., Pankey E.A. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2015. 309(4): H605-14.
12. Vaughan-Jones R.D., Spitzer K.W. // Biochem. Cell Biol. 2002. 80: 579-96.
13. Singha S., Kim D., Roy B. et al. // Chem. Sci. 2015. 6: 4335-42
14. Лакович Дж. // Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
15. Yan L., Gu Q.S., Jiang W.L. et al. // Anal Chem. 2022. 94(14): 5514-20.

## ВЛИЯНИЕ EGCg НА РЕГУЛЯТОРНУЮ ФУНКЦИЮ ТРОПОМИОЗИНА С МУТАЦИЕЙ E150A

*Тишкова М.В., Богданов А.Л., Сиренко В.В.,  
Карпичева О.Е., Боровиков Ю.С.*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Хорошо известно, что в основе мышечного сокращения лежит взаимодействие актина и миозина, сопровождаемое гидролизом АТФ в активном центре головки миозина. В скелетной мышце регуляцию сокращения осуществляет тропонин-тропомиозиновый комплекс, связанный с актиновыми нитями и придающий им чувствительность к ионам кальция. Мутации в генах, кодирующих мышечные белки, приводят к изменениям в механизмах регуляции мышечного сокращения и нарушениям функционирования саркомера [1]. Было показано, что одна из таких мутаций, приводящая к аминокислотной замене Glu150Ala (E150A) в  $\gamma$ -тропомиозине (Tpm3.12) и связанная с кэп-миопатией, вызывает смещение тропомиозина к внутренним доменам актина и увеличивает число головок миозина в состоянии сильного связывания, приводя к повышению кальциевой чувствительности сократительной системы [2]. Эти отклонения способны нарушать мышечное расслабление и являться причиной быстрой утомляемости мышц, появления мышечной слабости и развития контрактур. При тяжелой степени заболевания мышечная слабость приводит к дыхательной и сердечной недостаточности [3]. Терапевтических подходов к лечению наследственных миопатий до сих пор не разработано и существует острая необходимость в поиске адекватных химических агентов, способных препятствовать возникновению и прогрессированию мышечной слабости. Ранее было обнаружено, что связывание биологически активного компонента зеленого чая галлата эпигаллокатехина (EGCg) с тропонином С в демембранизированных мышечных волокнах, изолированных из сердечной мускулатуры мыши с гипертрофической кардиомиопатией, снижает аномально высокую кальциевую чувствительность [4,5]. Однако в скелетных мышцах влияние EGCg на сократительную функцию до сих пор не исследовалось. Целью нашей работы стала попытка нормализовать с помощью EGCg регуляцию актин-миозинового взаимодействия, нарушенную в присутствии замены E150A в тропомиозине, непосредственно в одиночных скелетных мышечных волокнах.

**Методы.** Изучение конформационных перестроек актина, миозина и тропомиозина проводили в «теневых» мышечных волокнах с реконструированной регуляторной и сократительной системами. Теневые волокна получали из глицеринизированных мышечных волокон путем

экстракции регуляторных белков и миозина до получения моделей, состоящих на 80–90% из чистого фибриллярного актина. Затем в теньевые волокна вводили мышечные белки тропонин, рекомбинантный тропомиозин и меченный флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS субфрагмент-1 миозина, которые легко проникали внутрь волокна и взаимодействовали с актином. Конформационные перестройки миозиновых головок исследовали с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии на основании изменения характеристик флуоресцентного зонда при моделировании стадий АТФазного цикла и разных функциональных состояний тонкой нити.

**Результаты.** Галлат эпигаллокатехин не изменял АТФазную активность и  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность тропонин-тропомиозиновой системы в растворе скелетных мышечных белков, что согласуется с данными, представленными ранее в литературе [4]. Высокоскоростное со-осаждение тропомиозина, содержащего замену E150A, с F-актином показало снижение сродства мутантного тропомиозина к актину. Однако в высокоорганизованной системе мышечного волокна тропомиозин с мутацией E150A связывался с актином в достаточном количестве, показывая небольшое снижение на  $10 \pm 2\%$  по сравнению с тропомиозином дикого типа. Анализ поляризованной флуоресценции зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с Cys707 субфрагмента-1 миозина, обнаружил в присутствии EGCg при моделировании сильных форм связывания миозина с актином (в отсутствие нуклеотида и в присутствии АДФ при высокой концентрации ионов кальция) повышение параметра  $\Phi_E$ , что характерно для наклона головок миозина от оси мышечного волокна и ослабления взаимодействия миозина с актином. При моделировании слабой формы связывания миозина с актином (в присутствии АТФ при низкой концентрации ионов кальция) EGCg, наоборот, снижал значение параметра  $\Phi_E$ , что характеризовало наклон головок к оси мышечного волокна и задерживание некоторого количества головок миозина в сильной форме связывания с актином.

**Обсуждение.** Как и многие мутации, приводящие к изменению локального поверхностного заряда тропомиозина и связанные с кэп-миопатией, мутация E150A снижала сродство тропомиозина к актину в растворе мышечных белков, однако не препятствовала встраиванию тропомиозина в компартмент тонких нитей в мышечном волокне. Полученные нами ранее данные [2] дают представление о потенциальных мишенях, на которые можно воздействовать для восстановления сократительной функции в присутствии мутации E150A в Trp3.12 непосредственно в саркомере. Такими мишенями может служить ингибирование сильных форм связывания миозина с актином и снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности тропонин-тропомиозиновой регуляции. Предварительные данные показали, что EGCg ингибирует образование сильной формы связывания миозина с актином при высокой концентрации



ионов кальция и увеличивает популяцию головок миозина в сильной форме связывания при моделировании расслабления. EGCg существенно ингибирует конформационные перестройки головок миозина при моделировании перехода между сильной и слабой формами связывания миозина с актином, то есть не позволяет поперечным миозиновым мостикам эффективно проходить стадии АТФазного цикла.

**Выводы.** Впервые показано, что ингибитор тропонина EGCg способен модулировать регуляторную функцию тропонин-тропомиозиновой системы в скелетном мышечном волокне, однако не приводит к нормализации актин-миозинового взаимодействия в присутствии тропомиозина с мутацией E150A, связанной с кэп-миопатией.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-24-00534).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sewry C.A., Laitila J.M., Wallgren-Pettersson C.* // Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2019. 40: 111-26.
2. *Borovikov Y.S. et al.* // International Journal of Molecular Sciences 2018. 19(12): 3975.
3. *Finsterer J., Stöllberger C.* // Pediatric neurology. 2015. 53(6): 473-7.
4. *Tadano N. et al.* // British journal of pharmacology. 2010. 161(5): 1034-43.
5. *Yuejin L. et al.* // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2022. 22(18): 2371-82.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА УГНЕТАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГАМК НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ МИОТРУБОК В КУЛЬТУРЕ

*Токмакова А.Р.<sup>1</sup>, Сибгатуллина Г.В.<sup>1</sup>,  
Гилиждинова К.Р.<sup>2</sup>, Маломуж А.И.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики

ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup>Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань, Россия

**Введение.** Изучение процессов миогенеза и сигнальных путей его регуляции имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку это позволяет понять причины возникновения ряда заболеваний, связанных с изменениями в мышечном аппарате, и способствует разработке подходов для их лечения. Кроме того, эти знания создают фундамент для направленных исследований в области тканевой инженерии и регенеративной клеточной терапии для лечения атрофии

мышц различного генеза и восстановления скелетной мышцы вследствие травматического повреждения.

Процесс образования любой скелетной мышцы из клеток предшественников – миобластов достаточно сложный и в нем выделяют несколько стадий, среди которых одной из ключевых является стадия слияния миоцитов в миотрубки (незрелые мышечные волокна) [1].

К настоящему моменту установлен целый ряд генов и сигнальных каскадов, управляющих процессами слияния мышечных клеток в миотрубки [2]. Относительно недавно были получены экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что в процессе миогенеза у млекопитающих может участвовать и такая сигнальная молекула как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), которую ранее рассматривали исключительно в качестве одного из основных нейромедиаторов центральной нервной системы [3]. Молекулы этой аминокислоты обнаруживаются в цитоплазме, как развивающихся миоцитов, так и в образуемых миотрубках. По мере созревания мышечного волокна количество ГАМК снижается, и в зрелых волокнах она не обнаруживается [4]. Это и позволило предположить активное участие данной аминокислоты на ранних стадиях миогенеза. В пользу данного предположения свидетельствуют экспериментальные данные, демонстрирующие угнетение процесса слияния миоцитов при повышении внеклеточной концентрации ГАМК [5]. Однако каков механизм этого влияния аминокислоты и какие белки могут опосредовать данный процесс оставалось до сих пор не выясненным, что и стало целью настоящего исследования.

**Методы.** Все эксперименты проведены в строгом соответствии с международными биоэтическими нормами и одобрены биоэтическим комитетом КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Эксперименты проводили на культуре миоцитов, выделенных из икроножной мышцы 3-х дневных крыс, согласно протоколу [6]. Процесс образования миотрубок в культуре оценивался по подсчету индекса слияния, который определяется как соотношение числа ядер в миотрубках к общему числу ядер в поле зрения [7]. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов проводили по методике, описанной нами ранее [4]. Наличие в мембранах культивируемых клеток белков-кандидатов, способных опосредовать влияние внеклеточной ГАМК (ГАМК<sub>D</sub> рецепторы и ГАМК транспортеры) оценивали с помощью соответствующих специфических антител: для рецепторов – GABA<sub>D</sub> (1:200; Santa Cruz Biotechnology, США), для транспортеров – GAT-2 (1:200; Alamone Labs, Израиль).

Добавление в культуру фармакологических препаратов осуществлялось однократно на 3-и сутки культивирования, оценку параметров проводили через 24 часа после внесения препаратов. В исследовании использовали: ГАМК (10 мМ, Sigma-Aldrich, США),

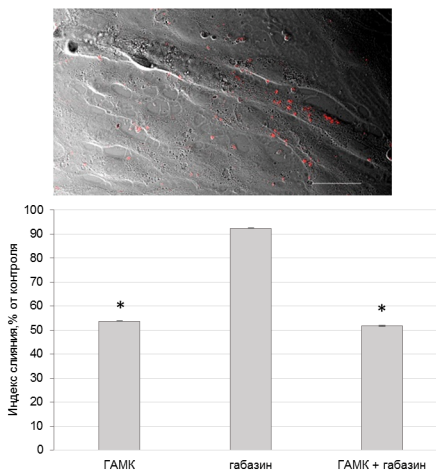
антагонист ионотропных ГАМК<sub>A</sub> рецепторов габазин (10 мМ, Sigma-Aldrich) и блокатор ГАМК транспортеров никотиновая кислота (10 мМ, Sigma-Aldrich).

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий оценивали с помощью ANOVA. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Контрольное значение индекса слияния к 4-му дню составило 0.15, т.е. 15% ядер от всей популяции культивируемых клеток находилось в миотрубках. При добавлении в среду ГАМК в концентрации 10 мМ наблюдалось снижение индекса слияния на 47% ( $p < 0.05$ ).

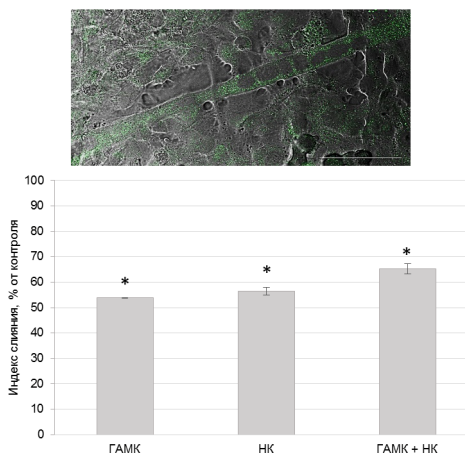
Сигнальная функция ГАМК опосредуется как рецепторами, так и транспортерами [8,9]. Поскольку на культуре миоцитов *Xenopus* были выявлены ионотропные функциональные ГАМК<sub>A</sub> рецепторы, а в нервно-мышечном синапсе крысы обнаружены ГАТ-2 транспортеры ГАМК, то именно на них и решено было сосредоточить внимание в нашем исследовании [10,11].

Иммуногистохимическое окрашивание культуры миоцитов на ГАМК<sub>A</sub> рецепторы не выявило наличия этих рецепторов на миоцитах. В то же время на поверхности образуемых в культуре миотрубок наблюдалось специфическое окрашивание (рис. 1), свидетельствующее о том, что миотрубки млекопитающих экспрессируют ГАМК<sub>A</sub> рецепторы.



**Рис. 1.** Отсутствие эффекта блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов габазина (10 мМ) на угнетающее миогенез действие ГАМК (10 мМ). *Вверху* – иммунопозитивное гистохимическое окрашивание миотрубки на наличие ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. Масштаб = 50 мкм. *Внизу* – изменения индекса слияния миоцитов в присутствии ГАМК, габазина и габазин+ГАМК, выраженные в % от контрольного значения.

Возможность участия этих рецепторов в угнетающем влиянии аминокислоты на процесс образования миотрубок оценивали с помощью аппликации блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов габазина [12]. Добавление только данного антагониста в концентрации 10 мМ не оказало никакого влияния на индекс слияния миоцитов, а в присутствии габазина ГАМК продолжал оказывать свое угнетающее влияние на образование миотрубок в полном объеме и индекс слияния снизился на 50% (рис. 1). Следовательно, механизм ингибирующего действия ГАМК на процесс образования миотрубок никак не затрагивает ионотропные ГАМК<sub>A</sub> рецепторы, экспрессирующиеся на сарколемме развивающихся мышечных волокон.



**Рис. 2.** Угнетающий эффект блокатора ГАМК транспортов никотинической кислоты (НК, 10 мМ) на процесс образования миотрубок и отсутствие влияния ГАМК (10 мМ) при совместной аппликации с этим блокатором. *Вверху* – иммунопозитивное гистохимическое окрашивание миотрубки на наличие GAT-2 транспортеров ГАМК. Масштаб = 50 мкм. *Внизу* – изменения индекса слияния миоцитов в присутствии ГАМК, НК, НК+ГАМК, выраженные в % от контрольного значения.

При иммуногистохимическом окрашивании культуры на транспортер ГАМК (GAT-2) были получены следующие данные. На первые сутки иммуноположительную реакцию к антителам имели единичные миоциты. На 2-е сутки их количество увеличивалось. На 3-и сутки флуоресцентный сигнал исходил как от миоцитов, так и от миотрубок, демонстрируя достаточно яркую специфическую окраску (рис. 2). Для оценки роли транспортеров ГАМК в механизме угнетающего миогенез эффекта экзогенной аминокислоты использовали ингибитор этих белков – никотиническую кислоту [13]. Аппликация этого

фармакологического агента в концентрации 10 мМ привело к снижению индекса слияния на 43% от контроля ( $p < 0.05$ ). В то же время ГАМК в присутствии нипекотиновой кислоты полностью терял способность оказывать угнетающее влияние на миогенез и значение индекса слияния при совместной аппликации аминокислоты и блокатора не отличалось от значения, полученного только в присутствии нипекотиновой кислоты (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в миотрубках присутствуют и функционируют ГАМК транспортеры (как минимум, GAT-2) и их инактивация приводит к ингибированию образования миотрубок. Вероятно, именно ГАМК транспортеры ответственны за реализацию угнетающего миогенез эффекта экзогенной ГАМК.

**Заключение.** В настоящем исследовании были получены результаты, подтверждающие ранее высказанное предположение об участии аминокислоты ГАМК в ранних этапах развития скелетной мускулатуры [4,5]. Судя по всему, выявленный угнетающий эффект аминокислоты на миогенез обусловлен увеличением ее концентрации в саркоплазме, поскольку и блокатор ГАМК транспортеров (способных выкачивать аминокислоту из клетки) и повышение внеклеточной концентрации ГАМК (также препятствующее снижению уровня аминокислоты в клетке) негативно сказывается на образовании миотрубок. При этом активация/инактивация выявленных на миотрубках ГАМК<sub>A</sub> рецепторов на процессе образования миотрубок никак не сказывается.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ Казанский научный центр РАН с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Abmayr S.M., Pavlath G.K.* // Development. 2012. 139(4): 641-56.
2. *Murphy M., Kardon G.* // Curr Topics Develop Biol. 2011. 96: 1-32.
3. *Watanabe M., Maemura K., Kanbara K. et al.* // Int. Rev. Cytol. 2002. 213: 1-47.
4. *Sibgatullina G.V., Malomouzh A.I.* // Protoplasma. 2020. 257(3): 1009-15.
5. *Sibgatullina G., Al Ebrahim R., Gilizhdinova K. et al.* // Cells Tissues Organs. 2023.
6. *Das M., Rumsey J.W., Bhargava N. et al.* // Biomaterials. 2010. 31(18): 4880-8.
7. *Baccam A., Benoni-Sviercovich A., Rocchi M. et al.* // Front. Physiol. 2019. 10: 401.
8. *Wu C., Sun D.* // Metab Brain Dis. 2015. 30(2): 367-79.
9. *Zhou Y., Danbolt N.C.* // Front Endocrinol (Lausanne). 2013. 11(4): 165.
10. *Borodinsky L.N., Spitzer N.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. 104(1): 335-40.
11. *Nurullin L.F., Nikolsky E.E., Malomouzh A.I.* // Acta Histochem. 2018. 120(3): 298-301.
12. *Bai D., Zhu G., Pennefather P. et al.* // Mol. Pharmacol. 2001. 59(4): 814-24.
13. *Moldavan M., Cravetchi O., Allen C.N.* // J. Neurophysiol. 2017. 118(6): 3092-106.

# ГЛУТАМАТ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЯ pH В ЦИТОЗОЛЕ, ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ И МАТРИКСЕ МИТОХОНДРИЙ НЕЙРОНОВ ИЗ МОЗГА КРЫС

*Шарипов Р.Р.<sup>1</sup>, Жердев А.А.<sup>1</sup>, Савинкова И.Г.<sup>2</sup>, Горбачева Л.Р.<sup>2,3</sup>,  
Пинелис В.Г.<sup>4</sup>, Некрасова А.А.<sup>4</sup>, Бакаева З.В.<sup>4,5</sup>, Сурин А.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия

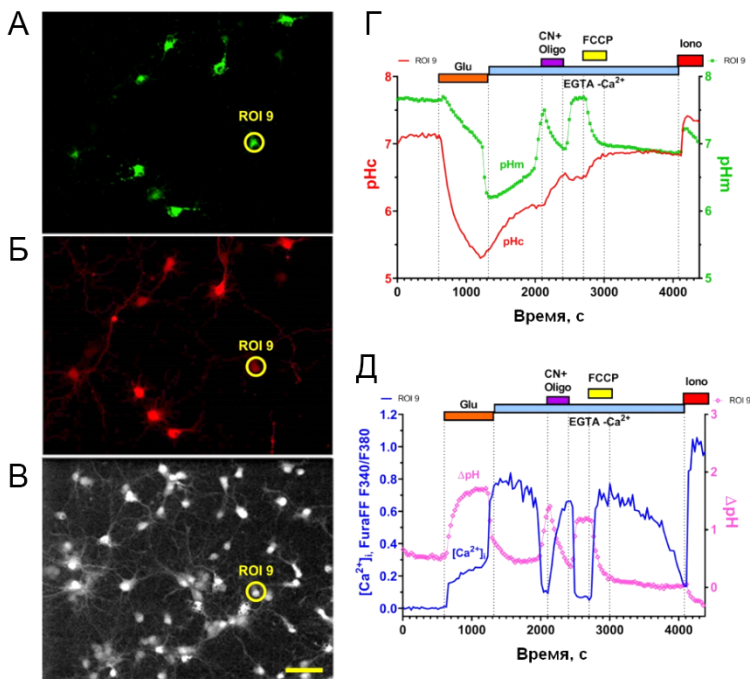
**Введение.** Гиперстимуляция рецепторов глутамата (Glu) приводит к чрезмерному поступлению в цитозоль нейронов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , что вызывает отсроченную кальциевую дисрегуляцию (ОКД) [1,2]. При этом происходит закисление цитоплазмы и митохондрий, обусловленное работой  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменников плазмалеммы [3], и митохондриальным  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменом [4].

**Материалы и методы.** Первичные нейрональные культуры из гиппокампа новорожденных крыс получали, как описано в [5]. Флуоресцентные измерения проводили в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 20 HEPES, 5 D-глюкозы; pH 7.4.

Для измерения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) клетки нагружали Fura-FF/AM. Для измерения pH митохондрий, эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и цитозоля плазмиды, несущие гены адресных белков, доставляли в клетки, используя Lipofectamin-2000.

Измерения проводили на инвертированном микроскопе Olympus IX-71, оснащенный системой освещения и CCD-камерой. Для получения и обработки данных использовали программы MetaFluor, Microsoft Excel, GraphPad Prism и Fiji (ImageJ).

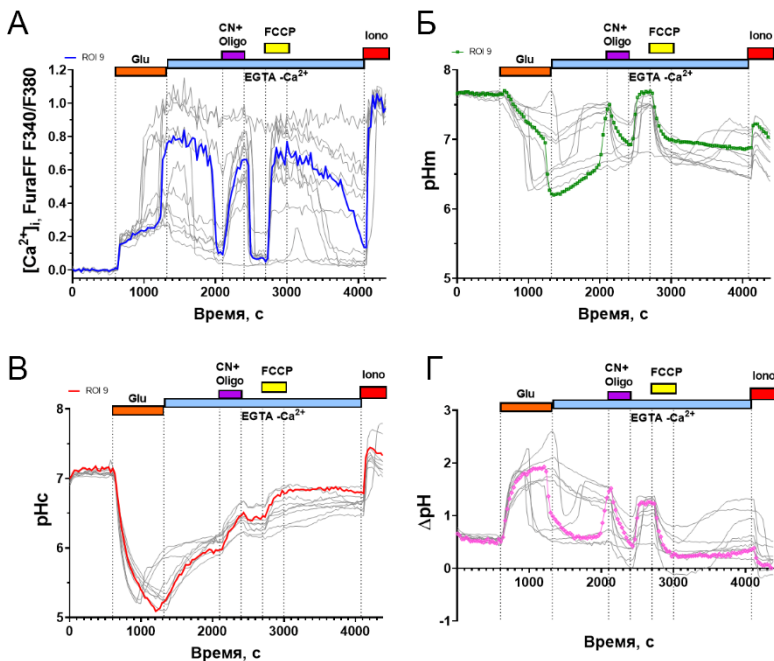
**Результаты и обсуждение.** Чтобы выяснить, как соотносятся изменения pH митохондрий (pHm), ЭПР (pHe) и цитозоля (pHc) с изменениями  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в индивидуальных нейронах, клеточную культуру нагрузили Fura-FF (рис. 1B) и выбирали участок, в котором находилось как можно больше нейронов, экспрессирующих одновременно зеленый митохондриальный флуоресцентный белок mtYFP [4] (рис. 1A) и красный цитозольный флуоресцентный белок mKate [6] (рис. 1B) или красный белок fusionRed с меткой в ЭПР [7] (рис. 3).



**Рис. 1.** Экспрессия одновременно двух флуоресцентных белков и окрашивание нейронов  $\text{Ca}^{2+}$  индикатором позволяет сопоставить изменения pH в митохондриях и цитозоле (pHm и pHc) с изменениями  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Изображения гиппокампальных нейронов, (А) экспрессирующих зеленый белок mtYFP в митохондриях, (Б) красный белок mKate в цитозоле и (В) нагруженных  $\text{Ca}^{2+}$  индикатором Fura-FF (возб. 340, 380, испуск. 525 нм). (Г) Графики изменений pHm и pHc одного из нейронов (ROI 9; обведен кружком) при действии токсических доз глутамата (Glu), а также ингибитора дыхания цианида (CN, 3 мМ), ингибитора митохондриальной АТФ-азы олигомицина (Oligo, 2.5 мкг/мл) и протонифера FCCP (1 мкМ). (Д) Графики изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолом ( $\Delta\text{pH}$ ) того же нейрона (ROI 9). Масштабный отрезок на панелях А, Б, В соответствует 40 мкм.

На рис. 2А показаны изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  для нейронов, окрашенных Fura-FF, mtYFP и mKate. Трансфекция не отменила описанной ранее индивидуальности развития ОКД в нейронах в ответ на Glu [8]. Изменения pHm, pHc, были также индивидуальны для каждого нейрона (рис. 2).

Сразу после добавления Glu одновременно со скачком  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (рис. 1Д, 2А) происходило снижение pHm и pHc (рис. 1Г, 2Б, 2В). Динамика pHm и pHc различалась, что приводило к росту  $\Delta\text{pH}$ . По мере стабилизации изменений  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время лаг-периода, предшествующего началу ОКД, стабилизировались также изменения  $\Delta\text{pH}$  (рис. 1Д, 2Г).



**Рис. 2.** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  и pH в цитозоле (pHc) и в матриксе митохондрий (pHm) клеток гиппокампа крысы, изображения которых представлены на рис. 1. А – Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках, экспрессировавших одновременно флуоресцентные белковые pH-сенсоры в цитозоле (mKate) и митохондриях (mtYFP). Б – Изменения сигналов mtYFP, (Г) mKate и (Д)  $\Delta pH$ .

Выполненные ранее нами [8,9] и другими [10] исследования показали, что изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в ответ на токсическую концентрацию Glu имеют «зеркальный» характер относительно изменений митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ). В момент добавления Glu происходит сравнительно небольшой скачок  $[Ca^{2+}]_i$  от базального  $\sim 100$  нМ [10] до нескольких микромолей/литр (первая фаза подъема  $[Ca^{2+}]_i$ ) [8,10]. За счет дыхания и  $Ca^{2+}/H^+$  обмена между матриксом митохондрий и цитозолем, умеренное снижение  $\Delta\Psi_m$  на  $\sim 60$  мВ во время первой фазы  $[Ca^{2+}]_i$  ответа на Glu [2] компенсируется ростом  $\Delta pH$  на  $\sim 1$  (рис. 1Д, 2Г).

Такой рост  $\Delta pH$  соответствует росту электрохимического потенциала митохондрий на  $\sim 60$  мВ и происходит за счет  $Ca^{2+}/H^+$ -обмена, осуществляемого совокупным действием  $Ca^{2+}$ -унипортера, насосов дыхательной цепи (комплексов I, III и IV), и системой  $Ca^{2+}/3Na^+$ - и  $Na^+/H^+$ -обменников. Такая компенсация сохраняет способность митохондрий поддерживать необходимую скорость синтеза АТФ в условиях его повышенного потребления ионными насосами плазматической мембраны.



При продолжительном действии Glu наступает вторая фаза изменений  $[Ca^{2+}]_i$ , названная ОКД, при которой  $[Ca^{2+}]_i$  поднимается до десятков микромолей/литр [11]. Этот подъем происходит всегда синхронно с сильным падением  $\Delta\Psi_m$  [5,8]. До конца не ясно, происходит ли выброс  $Ca^{2+}$  из митохондрий одновременно с деполяризацией или же больше сказывается поступление  $Ca^{2+}$  извне. В развитие ОКД вовлечены различающиеся процессы, поскольку удаление  $Ca^{2+}$  из буфера в начале ОКД быстро снижает  $[Ca^{2+}]_i$ , тогда как смена буфера на бескальциевый в фазе высокого  $[Ca^{2+}]_i$  плато влияет на  $[Ca^{2+}]_i$  гораздо слабее [8,9].

При ОКД происходило дополнительное снижение  $pH_m$ , тогда как падение  $pH_c$  замедлялось или даже сменялось его ростом (рис. 1Г, 2Б, 2В), в результате чего  $\Delta pH$  снижалась (рис. 2Г) до  $\sim 0.5$  единиц  $pH$  (рис. 1Д и рис. 2Г), т.е. до уровня в покоящихся нейронах. Полного коллапса  $\Delta pH$  не происходит. Это свидетельствует о том, что в этих условиях едва ли проявляется классическая мегапора (мРТР). Иначе  $\Delta pH$  стал бы равен 0.

Отмывание Glu бескальциевым буфером приводило к снижению  $[Ca^{2+}]_i$ , если не наступила ОКД (рис. 2А). Если в клетках развилась ОКД, то восстановление низкой  $[Ca^{2+}]_i$  происходило с задержкой, а в некоторых клетках не восстанавливалась за время измерений. Во время  $[Ca^{2+}]_i$  плато происходило постепенное защелачивание матрикса, которое ускорялось в постглютаматный период при восстановлении низкой  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 1Г и 2Б).

В цитозоле падение  $pH$  сменялось ростом при ОКД или при прекращении действия Glu (рис. 1Г и 2В). То есть, в постглютаматный период происходило постепенное выравнивание градиента  $pH$  между матриксом митохондрий и цитозолем, однако ни в одной из клеток за время действия Glu не наступило коллапса  $\Delta pH$  (рис. 2Г).

Добавление ингибитора комплекса IV дыхательной цепи цианида ( $NaCN$ , 3 мМ) в сочетании с ингибированием  $F_0F_1$ АТФ-азы олигомицином (Oligo, 2.5 мкг/мл), вызывающее коллапс  $\Delta\Psi_m$ , быстро увеличивало  $[Ca^{2+}]_i$  в результате мобилизации  $Ca^{2+}$  из митохондрий в цитозоль (рис. 1Д и рис. 2А). Причиной роста  $[Ca^{2+}]_i$  являлась ликвидация электрофоретической силы, удерживавшей  $Ca^{2+}$  в матриксе митохондрий [8].

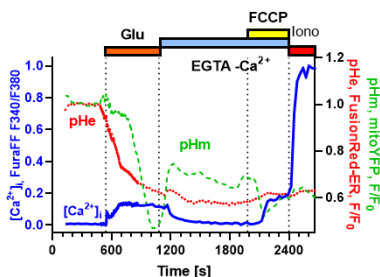
Цианид резко закислял матрикс и ускорял защелачивание цитозоля, сближая величины  $pH_m$  и  $pH_c$  (рис. 1Г и 2Б, 2В). Очевидно, при остановке дыхательной цепи утечка протонов сквозь внутреннюю мембрану митохондрий способна быстро обнулить  $\Delta pH$  (рис. 1Д и 2Г).

Отмывание  $NaCN$  быстро понижало  $[Ca^{2+}]_i$  в большинстве клеток (рис. 2А). Очевидно, в результате разблокирования комплекса IV дыхательной цепи происходило восстановление  $\Delta\Psi_m$  и возобновление захвата  $Ca^{2+}$  митохондриями.

Отмывание цианида восстанавливало  $pH_m$  до уровня, предшествовавшего действию митохондриального яда (рис. 2Б). Это

наблюдение согласуется с тем, что дыхательная цепь возобновила выкачивание протонов из матрикса в цитозоль, повышая, тем самым, рНм.

Протонофор FCCP (1 мкМ) резко увеличил  $[Ca^{2+}]_i$  и уменьшал разницу между рНм и рНе (рис. 2). Скачок  $[Ca^{2+}]_i$ , индуцированный FCCP, согласуется с тем, что понижение  $[Ca^{2+}]_i$  после удаления NaCN обусловлено именно поглощением  $Ca^{2+}$  митохондриями. Примечательно, что при длительном отмывании FCCP часть клеток смогла начать понижение  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 2А) и повышение  $\Delta pH$  (рис. 3Г), показывая тем самым, что даже после длительных и разнообразных воздействий гиппокампальные нейроны сохранили способность поддерживать активность митохондрий.



**Рис. 3.** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$ , рН в люмене ЭПР (рНе) и в матриксе митохондрий (рНм) нейронов коры мозга крысы. Измерения  $[Ca^{2+}]_i$  и рНм выполнены, как указано в подписи к рис. 1. рНе оценен с помощью белка fusionRed-ER, имеющего те же параметры съемки, что и mKate, но с меткой ЭПР. Нормировали относительно начального значения, (F/F<sub>0</sub>).

Деполяризация митохондрий во время ОКД и в постглютаматный период вызывает высвобождение  $Ca^{2+}$  в цитозоль, сопряженное с захватом митохондриями протонов. Возникающее закисление матрикса митохондрий вызывает, по-видимому, растворение  $Ca^{2+}$ -фосфатных комплексов [12] и дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  из митохондрий, обеспечивая дополнительное поступление протонов в матрикс. Формально, подобный процесс работает по принципу положительной обратной связи, или «порочного круга».

При воздействии Glu на нейроны возникает стресс ЭПР [13]. ЭПР имеет контакты с митохондриями через митохондриально-ассоциированные мембраны (МАМ) [14]. Мы проверили как будет изменяться рН в ЭПР (рНе) при действии Glu. Добавка Glu вызывает снижение рНе, (рис. 3) похожее на падение рНс (рис. 1Г, 2В) и опережающее рНм (рис. 3). Удаление Glu не восстанавливало рНе. Добавка протонофора в бескальциевом буфере вызвала падение рНм, но слабо влияла на рНе в сторону повышения при высвобождении  $Ca^{2+}$  из

митохондрий. Иономицин, являющийся трансмембранным  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -переносчиком, не оказывал влияния на рНс. Изменения рНс заслуживают более подробного исследования, поскольку затрагивают  $\text{Ca}^{2+}$ -обмен между ЭПР и митохондриями.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wang Y., Qin Z. // Apoptosis. 2010. 15(11): 1382-402.
2. Nicholls D.G., Ward M.W. // Trends Neurosci. 2000. 23(4): 166-74.
3. Hwang S.M., Koo N.Y., Jin M. et al. // J. Biol. Chem. 2011. 286(3): 1719-29.
4. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G. et al. // Cell Calcium. 2008. 43(6): 602-14.
5. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. // Патогенез. 2014. 12(4): 40-6.
6. Shcherbo D., Merzlyak E., Chepurnykh T. et al. // Nat. Methods. 2007. 4(9): 741-6.
7. Roderick H.L. et al. // FEBS Lett. 1997. 405(2): 181-5
8. Khodorov B. // Progr. Biophys. Mol. Biol. 2004. 86(2): 279-351.
9. Шарунов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г. и др. // Биол. Мембраны. 2018. 35(5): 384-97.
10. Abramov A.Y., Duchon M.R. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. 1777(7-8): 953-64.
11. Kiedrowski L. // Mol. Pharmacol. 1999. 56(3): 619-32.
12. Chalmers S., Nicholls D.G. // J. Biol. Chem. 2003. 278(21): 19062-70.
13. Szydłowska K., Tymianski M. // Cell Calcium. 2010. 47(2): 122-9.
14. Krols M., van Isterdael G., Asselbergh B. et al. // Acta Neuropathol. 2016. 131(4): 505-23.

## ВВЕДЕНИЕ МИТОКИНА MOTS-C ПРЕДОТВРАЩАЕТ РОСТ УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНЫХ МЫШЦ НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

Шарло К.А., Львова И.Д., Сидоренко Д.А., Тыганов С.А., Шенкман Б.С.

ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия

**Введение.** Снижение или полное отсутствие нагрузки и опорного стимула позно-тонических скелетных мышц ведет к развитию таких негативных изменений как снижение максимальной силы мышцы, повышение их утомляемости и снижение окислительного потенциала, что сопровождается соответствующими изменениями на молекулярном уровне. В частности, при функциональной разгрузке мышц человека и животных наблюдается изменение паттерна экспрессии миозиновых генов в сторону преобладания «быстрых» миозиновых изоформ, обеспечивающих низкую устойчивость мышцы к утомлению, и снижение уровня экспрессии регулятора биогенеза митохондрий PGC1 $\alpha$  [1,2].

В последние годы был открыт класс биологически активных пептидов, синтезируемых в митохондриях в ответ на продолжительную мышечную активность и получивших название митокины. В частности, митокин MOTS-C способен повышать устойчивость мышц к утомлению, и активировать биогенез митохондрий [3]. Мы предположили, что функциональная разгрузка скелетных мышц должна приводить к снижению содержания митокина MOTS-C в камбаловидных мышцах и к соответствующим изменениям на молекулярном уровне. Целью нашей работы стало выявление роли MOTS-C в развитии повышенной мышечной утомляемости камбаловидной мышцы на фоне 7-суточного вывешивания крыс.

**Материалы и методы.** Самцы крыс линии Wistar были случайным образом разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: С – виварный контроль, 7HS – 7-суточная функциональная разгрузка с ежедневным введением плацебо (физраствор, внутривентриально), 7HM – 7-суточная функциональная разгрузка с ежедневным введением MOTS-C (внутривентриально, 40 мг/кг веса животного). Функциональную разгрузку проводили с помощью антиортостатического вывешивания задних конечностей грызунов [4], животные имели постоянный доступ к пище и воде. После проведения эксперимента животным вводили бромэтанольный наркоз, извлекали камбаловидные мышцы из обеих ног, одна из которых немедленно замораживалась в жидком азоте для дальнейшего выделения РНК, ДНК и тотальной белковой фракции, а вторая подвергалась анализу утомляемости *ex vivo*. Все процедуры были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 628, от 06.12.2022 г).

**Результаты.** Мы обнаружили, что индекс утомления (соотношение силы последнего сокращения в конце теста и максимальной силы сокращения мышцы) в группе 7HS достоверно снизился в сравнении с группой С, тогда как в группе 7HM оказался достоверно выше, чем в группе 7HS и не имел отличий от контроля. Содержание митокина MOTS-C в тотальной белковой фракции было достоверно снижено в группе 7HS в сравнении с группой С, при этом достоверных отличий между группами С и 7HM не наблюдалось. Экспрессия мРНК предшественника MOTS-C была достоверно снижена в обеих экспериментальных группах в сравнении с группой С, и группы 7HS и 7HM не различались между собой. Экспрессия мРНК PGC1 $\alpha$  была достоверно снижена в группе 7HS в сравнении с группой С, однако содержание PGC1 $\alpha$  в тотальной белковой фракции не различалось между группами С и 7HS; тем не менее, и содержание и экспрессия мРНК PGC1 $\alpha$  в группе 7HM были достоверно выше значений группы 7HS. Экспрессия «медленной» изоформы тяжелых цепей миозина MHC I не различалась между группами С и 7HS, при этом в группе 7HM была достоверно выше значений группы 7HS. Экспрессия

«быстрой, окислительной изоформы миозина МНС IIa была достоверно снижена в группе 7HS и не отличалась от контроля в группе 7HM, при этом экспрессия быстрых миозиновых изоформ МНС IIa/x и МНС IIb в группе 7HS была достоверно повышена в группе 7HS в сравнении с группой С, и не отличалась от группы С в группе 7HM. Фосфорилирование АМФ-активируемой протеинкиназы не отличалось от контроля в группе 7HS, но было достоверно повышено в сравнении как с группой С так и с группой 7HS в группе 7HM.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что введение MOTS-C на фоне 7-суточной функциональной разгрузки способствует активации АМФ-активируемой протеинкиназы, предотвращает повышение утомляемости, снижение содержания PGC1 $\alpha$ , и изменение паттерна экспрессии мРНК миозиновых генов на фоне 7-суточной функциональной разгрузки скелетных мышц.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 21-75-00063).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Baldwin K.M., Haddad F., Pandorf C.E. et al. // *Frontiers in physiology*. 2013. 4: 284.
2. Cannavino J., Brocca L., Sandri M. et al. // *The Journal of physiology*. 2014. 592: 4575-89.
3. Yang B., Yu Q., Chang B. et al. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. 2021. 1867(6): 166126.
4. Morey-Holton E.R., Globus R.K. // *Journal of applied physiology*. 2002. 92: 1367-77.

\*\*\*

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ

### ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ФАКТОРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Ганцова Е.А.<sup>1,3</sup>, Табеева Г.И.<sup>2</sup>, Стрелков М.С.<sup>1</sup>, Бутрим В.А.<sup>1</sup>, Шевцова Ю.С.<sup>2</sup>, Ибрагимова А.Г.<sup>1</sup>, Асатурова А.В.<sup>2</sup>, Силачев Д.Н.<sup>2</sup>, Фатхудинов Т.Х.<sup>1,3</sup>, Вишнякова П.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» Москва, Россия

**Введение.** Высокая частота внутриматочных вмешательств способствуют нарушению регенерации эндометрия, формированию фиброзной ткани и внутриматочных синехий, приводя к развитию «тонкого» эндометрия и/или синдрому Ашермана. Накапливающийся на сегодняшний день опыт применения клеточной терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) демонстрирует их высокие регенеративные и пролиферативные свойства для восстановления функционального потенциала эндометрия [1]. Участие МСК [2] в репарации тканей в большей степени происходит за счет паракринных эффектов, связанных с синтезом внеклеточных везикул (ВВ), стимулирующих клетки-предшественники и стволовые клетки в поврежденной ткани и оказывающих цитопротекторное, антиапоптотическое и ангиогенное действие [3]. Экзосомы представляют собой тип внеклеточных везикул размером 30-150 нм, содержащие компоненты (белок, ДНК и РНК) клеток, которые их секретируют [4]. В связи с этим перспективным направлением в решении данной проблемы является разработка бесклеточной терапии ВВ, выделенных из ММСК периваскулярного пространства пупочного канатика человека.

**Цель работы.** Изучить молекулярно-биологические механизмы влияния внеклеточных везикул (ВВ), выделенных из ММСК пупочного канатика человека, на пролифераторные свойства эндометрия в модели *in vitro*.

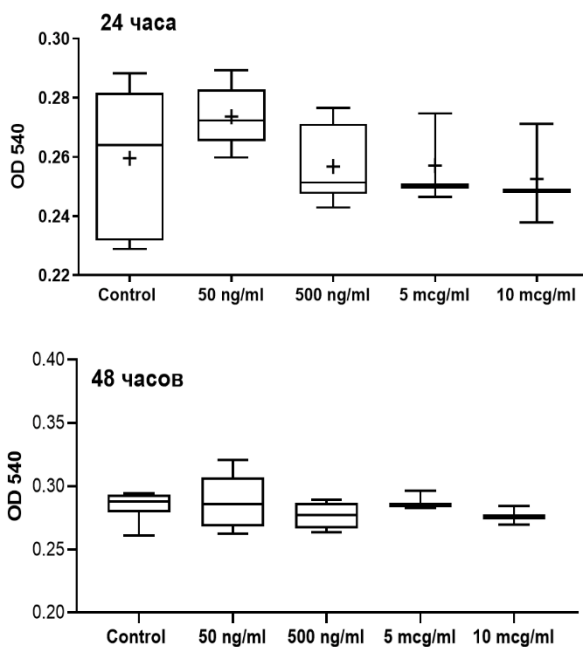
**Материалы и методы.** В ходе работы использовались следующие методы: культуральная работа, энзиматическая дезагрегация ткани, метод проточной цитометрии, анализ жизнеспособности клеток и апоптоза в культуре, определение клеточного индекса.

*Сбор биоматериала.* Сбор биопсий эндометрия проводили у пациенток с трубным фактором беременности ( $n=3$ ) с помощью урогенитального зонда в фазе пролиферации (6-8 день менструального цикла) в соответствии с рекомендациями и требованиями этического комитета (выписка из протокола № 9, 22/9/22). Все доноры перед включением в исследование подписывали добровольное информированное согласие на забор биопсии. Полученный материал помещали в 15 мл пробирку с транспортной средой (F12 с добавлением пенициллина-стрептомицина до 1%), промывали в растворе Хэнкса и измельчали, материал пропусклся через шприц G21. Сбор пуповины проводили у пациенток с физиологической беременностью в соответствии с рекомендациями и требованиями этического комитета (выписка из протокола (№ 5, 27/5/21). Выделение ММСК из пупочного канатика осуществляли методом энзиматической дезагрегации. Полученные ММСК культивировали в полной питательной среде, из которой выделяли экзосомы методом дифференциального ультрацентрифугирования.

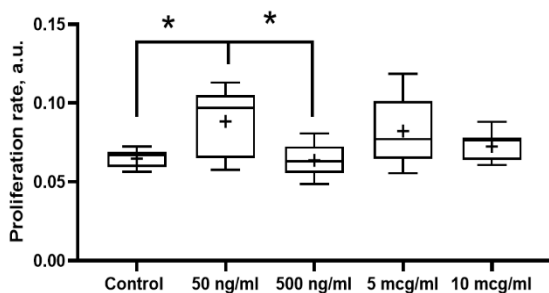
*Проточная цитометрия.* Для окрашивания поверхностных маркеров клетки ресуспендировали в промывочном растворе autoMACS® ( $1 \times 10^5$  клеток в 100 мкл) с 1% BSA и окрашивали анти-CD146, анти-CD90, анти-CD45, анти-ЕрСАМ, анти-Vimentin антителами. Анализ проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, США) с программами CellQuest и FlowJo.

*МТТ тест.* Клетки первичной культуры эндометрия рассаживали в 96-луночный планшет по 7000 кл/лунка. По достижении клетками 60-70% конfluenceности инкубировали 24/48 часов с экзосомами в разной концентрации. После инкубации удаляли среду и добавляли к клеткам раствор МТТ (1.5 мг/мл), в котором инкубировали в течение 4 ч при 37°C. После образования кристаллов формазана, добавляли 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность при длине волны  $\lambda = 540$  нм на планшетном спектрофотометре Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, США).

*Подсчет клеточного индекса.* Клеточный индекс создан для представления состояния клеток на основе относительного изменения электрического импеданса. Для этого клетки сажали в лунки на Е-планшете 96 (7000 кл/лунка). После 30-минутной инкубации при комнатной температуре Е-планшет 96 помещали в инкубатор для клеточных культур. Наконец, адгезию, рост и пролиферацию клеток контролировали каждые 15 минут в течение периода до 8 часов с помощью массивов встроженных сенсорных электродов E-Plate 96. Электрический импеданс измеряли с помощью программного обеспечения xCELLigence.



**Рис. 1.** Результаты МТТ анализа после инкубации первичной культуры клеток эндометрия с экзосомами в разной концентрации.



**Рис. 2.** Результаты импеданс-анализ с помощью технологии xCELLigence: представлен клеточный индекс культуры клеток эндометрия после инкубации в течение 70 часов с экзосомами в разной концентрации.



**Результаты.** В ходе работы были выделены и охарактеризованы экзосомы, полученные из кондиционированной среды ММСК пупочного канатика. Концентрация ВВ оценивалась спектрофотометрически по содержанию белка. Первичная культура эндометрия до добавления к ним экзосом была охарактеризована по классическим маркерам эпителиальных клеток (EpCAM), МСК (CD90, Vimentin), эндотелия (CD146) и лейкоцитов (CD45). Для исследования пролифераторных свойств экзосом в первичной культуре эндометрия был использован МТТ тест (рис. 1) и импеданс-анализ (рис. 2) с помощью технологии xCELLigence. Нами были протестированы 4 концентрации экзосом, добавляемых к клеткам: 50 нг/мл, 500 нг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл. Было показано, что концентрация экзосом 50 нг/мл является максимально эффективной для стимуляции роста клеток: мы наблюдали значимое повышение клеточного индекса в течение 70 часов культивирования с 50 нг/мл экзосом по сравнению с контрольными клетками. Также было показано увеличение процента Ki67+ клеток после 48 часов инкубации с 50 нг/мл ВВ. Методами ПЦР и реальном времени и вестерн блоттинга мы показали повышение экспрессии циклинов A1 и E2, отвечающих за вступление клетки в митоз и S фазу цикла соответственно.

**Выводы.** В концентрации 50 нг/мл ВВ, полученные из кондиционированной среды МСК пупочного канатика человека, обладают выраженными про-пролифераторными свойствами, что может заложить основу их использования в клинической практике для лечения заболеваний эндометрия.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00048).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Gharibeh N. et al. // Stem Cell Research & Therapy. 2022. 13(1): 33.*
2. *Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. // Гены и клетки. 2015. 2.*
3. *Abbaszadeh H. et al. // Journal of cellular physiology. 2020. 235(2): 706-17.*
4. *Stahl P.D., Raposo G. // Physiology. 2019.*

# НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

Калужная Ю.Н.<sup>1</sup>, Силачев Д.Н.<sup>2</sup>, Демьяненко С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория «Молекулярная нейробиология» Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

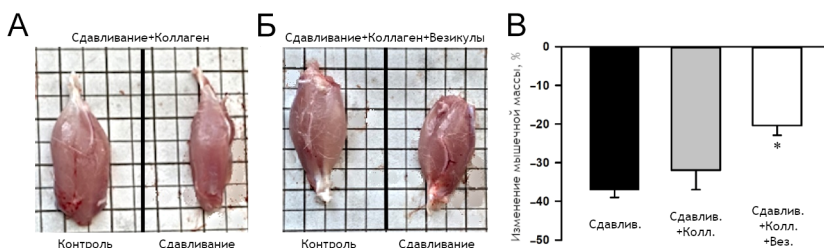
<sup>2</sup>Лаборатория клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

**Введение.** Повреждение периферических нервов по сей день остается серьезной клинической проблемой. В последние годы показано, что использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и продуцируемых ими внеклеточных везикул (ВВ) является перспективным методом восстановления поврежденных нервных волокон [1].

**Цель работы:** изучение влияния гелевого препарата внеклеточных везикул мультипотентных мезенхимальных клеток на уровень маркеров регенерации нервов, а именно белков NF-200, GAP-43 и βIII-тубулина в модельной системе повреждения седалищного нерва крысы.

**Материалы и методы.** Первичную культуру МСК и продуцируемые ими ВВ получали по протоколу, описанному ранее [2]. Опыты с раздавливанием седалищного нерва проведены на самцах крыс *Wistar* (2-2.5 месяцев; 200-250 г). Обнаружение седалищного нерва проводилось по стандартному протоколу [3], после чего нерв сдавливали беззубчатыми гемостатическими щипцами в течение 20 секунд до образования аксонотмезиса. Через 1 час на место сдавливания наносили коллагеновый гель с везикулами или без них. Через 15 и 30 дней животных декапитировали с последующим забором биоматериала: 4 и 5 ганглии задних корешков (dorsal root ganglia, DRG), участок нерва на 0.5-1 см проксимальнее места повреждения и участок икроножной мышцы. Влияние внеклеточных везикул на атрофию икроножной мышцы в поврежденной конечности оценивали путем подсчета процента изменения массы икроножной мышцы, а также измерения диаметра мышечных волокон. Функциональный дефицит поврежденной конечности оценивали с помощью теста «Разгибателя». Визуализацию апоптотических клеток проводили с помощью метода TUNEL, маркирующего разрывы нитей ДНК с использованием «набора для обнаружения гибели клеток *in situ*, TMR red» (№ 12156792910, Roche, Базель, Швейцария) [2]. Иммунофлуоресцентная микроскопия DRG крыс и поврежденных фрагментов нервов проводилась на срезах толщиной 40 мкм по стандартному протоколу [2]. Проводили оценку изменения уровня белков

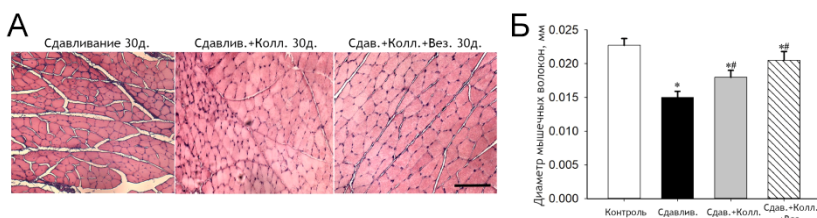
– маркеров регенерации периферических нервов: нейрофиламентов (NF), ассоциированного с ростом белка 43 (GAP-43), а также белка цитоскелета  $\beta$ III-тубулина [2]. В качестве первичных антикроличьих антител (АТ) использовались Anti-Neurofilament 200 (N4142), Anti-GAP-43 (SAB4300525) и Anti- $\beta$ III-Tubulin (T2200) в разведении 1:500, а также с антимышьиные АТ к нейроспецифическому ядерному белку Anti-NeuN (MAB377) в разведении 1:1000. Ядра клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (40 мкМ; 10 мин). Срезы помещали в 60% глицерин и исследовали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX-51 (Olympus, Токио, Япония), оснащенный цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония) или на флуоресцентном микроскопе Eclipse FN1 (Nikon, Япония). Данные измерений нормировали на интенсивность фоновой флуоресценции. Интенсивность флуоресценции NF-200 и GAP-43 на срезах DRG оценивали только в нейронах. Для  $\beta$ III-тубулина оценивали суммарную интенсивность флуоресценции в клетках DRG и срезах поврежденного участка нерва. Для оценки колокализации целевого белка с маркером нейронов NeuN рассчитали коэффициент Мандерса M1 с помощью программного обеспечения ImageJ с плагином «JACoP» [2]. Для представленных результатов значимость межгрупповых различий оценивалась с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Тьюки. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot v12.5 (Systat Software, Сан-Хосе, Калифорния, США).



**Рис. 1.** Потеря массы икроножной мышцы поврежденной конечности по отношению к массе мышцы интактной конечности через 30 дней после ущемления седалищного нерва. (А) Слева, вид на интактную мышцу конечности; справа, вид мышцы через 30 дней после сдавливания седалищного нерва. (Б) Слева, вид на неповрежденную мышцу конечности; справа вид мышцы через 30 дней после раздавливания седалищного нерва и нанесения препарата коллаген-везикул через 1 ч после травмы. (В) Изменение массы икроножных мышц через 30 дней после раздавливания седалищного нерва, применения коллагенового геля и препарата коллаген-везикул в % по отношению к массе контралатеральной мышцы.  $M \pm SEM$ ;  $n = 8$ ; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой с раздавливанием без лечения.

**Результаты и обсуждение.** Нанесение геля с везикулами на поврежденный участок нерва уменьшало атрофию икроножной мышцы, возникшую вследствие сдавливания седалищного нерва: потеря мышечной массы на 30-е сутки снижалась на 19% ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с группой со сдавливанием (рис. 1).

Уменьшение диаметра мышечных волокон, еще одного признака атрофии, наблюдалось в группе со сдавливанием, но нанесение геля или геля с везикулами увеличивало диаметр мышечных волокон на 19.3% ( $p \leq 0.05$ ) и 33.3% ( $p \leq 0.05$ ), соответственно, относительно группы со сдавливанием (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение диаметра мышечных волокон икроножной мышцы поврежденной конечности через 30 сут после передавливания седалищного нерва. (А) Вид мышечных волокон через 30 дней после сдавливания седалищного нерва, нанесения коллагенового геля и подготовки везикул коллагеном через 1 час после травмы. Окраска гематоксилином и эозином. Масштаб: 100 мкм. (Б) Изменение диаметра мышечных волокон икроножной мышцы через 30 сут после сдавливания седалищного нерва, нанесения коллагенового геля и везикулярного геля через час после травмы, мм.  $M \pm SEM$ ;  $n = 8$ ; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой с раздавливанием без лечения; # –  $p < 0.01$  по сравнению с интактными мышцами.

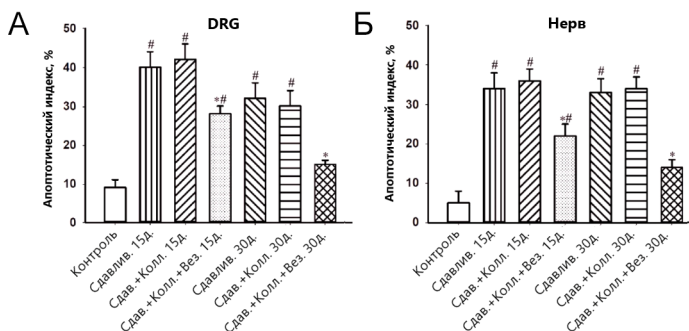
Через 30 дней после сдавливания седалищного нерва в группе с аппликацией геля, содержащего везикулы, отмечено повышение функционального состояния на 39% ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с группой без аппликации. Через 3, 7, 15 и 23 дня эффект от применения выражен не был (табл. 1).

**Табл. 1.** Функциональный дефицит поврежденной конечности по отношению к интактной конечности в % после ущемления седалищного нерва.

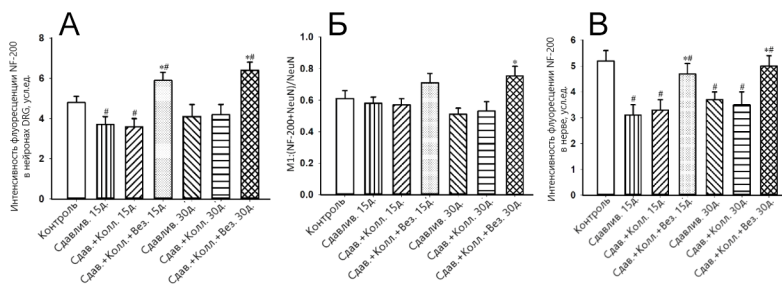
Группы	3 д	7 д	15 д	30 д
Сдавливание	-100 ± 2	-100 ± 2	-87 ± 8	-66 ± 12
Сдавлив. + Колл.	-100 ± 3	-100 ± 2	-100 ± 3	-50 ± 13
Сдав. + Колл. + Вез.	-100 ± 1	-100 ± 2	-81 ± 10	-40 ± 12 *

По данным TUNEL-анализа повреждение седалищного нерва приводило к развитию апоптотической гибели клеток в самом нерве и в клетках DRG [4]. Через 15 дней после травмы и нанесения препарата

везикул на место сдавливания апоптоз DRG снижался на 33% ( $p < 0.05$ ) (рис. 3), а апоптоз клеток поврежденного участка нерва – на 39% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой, которая не получала препарат или получившей только гель (рис. 3). Через 30 дней наблюдалось снижение числа апоптотических клеток в DRG на 50% ( $p < 0.05$ ) и в сегменте нерва на 59% ( $p < 0.05$ ) (рис. 3).



**Рис. 3.** Изменения индекса апоптоза в DRG (А) и срезах нервов (Б). М ± SEM; n = 8; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующими группами без лечения везикулами; #  $p < 0.05$  по сравнению с интактной группой.

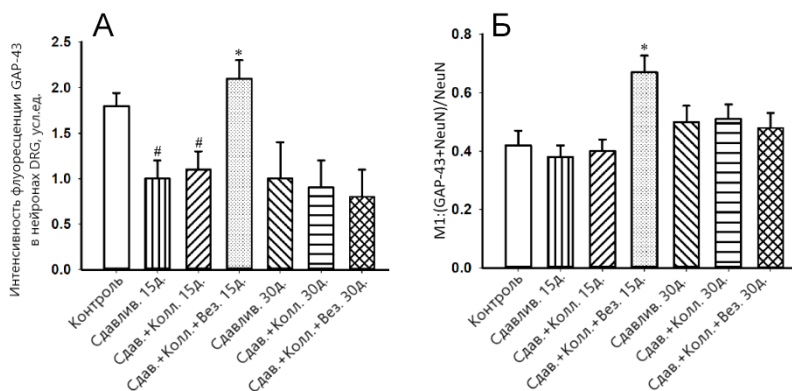


**Рис. 4.** (А) Относительная интенсивность флуоресценции NF-200 в нейронах DRG в разное время после раздавливания, без и с применением препарата везикул. (Б) Изменения коэффициента колокализации Мандерса M1 белка NF-200 и нейронального маркера NeuN. (В) Относительная интенсивность флуоресценции NF-200 в седалищном нерве; n = 7. М ± SEM; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующими группами без лечения везикулами; # –  $p < 0.05$  по сравнению с интактным нервом.

Спустя 15 дней после сдавливания седалищного нерва наблюдалось снижение уровня NF-200 на 23% ( $p < 0.05$ ) в DRG в группе с применением геля без везикул по сравнению с интактной группой (рис. 4А). Использование препарата везикулярного геля способствовало увеличению

уровня белка на 64% ( $p < 0.05$ ) через 15 дней и на 52% ( $p < 0.05$ ) через 30 дней, соответственно, по сравнению с группой, получавшей гель без везикул. Через 30 дней наблюдалось увеличение коэффициента колокализации NF-200 с NeuN на 54% ( $p < 0.05$ ) (рис. 4Б), что указывало на рост субпопуляции нейронов с фенотипом NF200+.

При изучении фрагмента нерва выявлено 40% ( $p < 0.05$ ) снижение уровня NF-200 через 15 дней в группе без применения геля и на 37% ( $p < 0.05$ ) в группе с коллагеновым гелем без везикул по сравнению с интактными нервами. Низкий уровень NF-200 в ткани седалищного нерва сохранялся даже через 30 дней после сдавливания. Применение везикулярного геля повышало уровень NF-200 на 42% ( $p < 0.05$ ) через 15 дней и на 43% ( $p < 0.05$ ) через 30 дней по сравнению с применением геля без везикул (рис. 4Б).

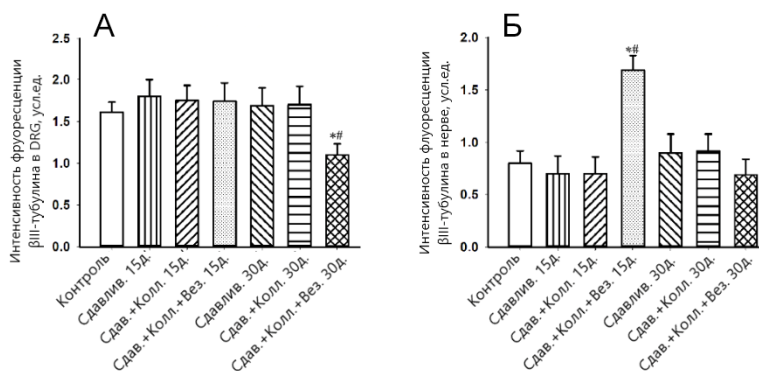


**Рис. 5.** (А) Относительная интенсивность флуоресценции GAP-43 в нейронах DRG в разное время после сдавливания с применением препарата везикул и без него. (Б) Изменение коэффициента колокализации Мандерса M1 белка GAP-43 с нейрональным маркером NeuN;  $n = 7$ .  $M \pm SEM$ ; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующими группами без лечения везикулами; # –  $p < 0.05$  по сравнению с интактным нервом.

Иммунофлуоресцентное окрашивание на белок GAP-43 использовали для обнаружения регенерирующих аксонов. Через 15 дней после операции наблюдалось статистически значимое повышение белка GAP-43 в DRG при однократном применении препарата везикул на 96.3% ( $p \leq 0.05$ ) по отношению к группе, получившей гель без везикул (рис. 5А). Изменение уровня колокализации GAP-43 с NeuN имеет схожую динамику, что свидетельствует об увеличении экспрессии GAP-43 именно в нейронах (рис. 5Б).

Было показано, что увеличение экспрессии GAP-43 при повреждении нервов коррелирует с увеличением синтеза тубулина.

Экспрессия  $\beta$ III-тубулина в DRG через 15 дней после нанесения везикул на участок сдавливания нерва не изменилась по сравнению с контрольной группой (рис. 6А). В экспериментах показано снижение уровня  $\beta$ III-тубулина в DRG при однократном применении геля с везикулами на 34.7% ( $p \leq 0.05$ ) относительно группы с применением безвезикулярного геля и на 32% ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с группой без нанесения геля через 30 дней после операции (рис. 6А). Однако уровень  $\beta$ III-тубулина в поврежденном участке нерва повышался на 53% ( $p \leq 0.05$ ) через 15 дней после сдавливания нерва и применения препарата везикул по сравнению с группой, получавшей гель без везикул (рис. 6Б).



**Рис. 6.** (А) Относительная интенсивность флуоресценции  $\beta$ III-тубулина в DRG в разное время после раздавливания, с обработкой везикул и без нее. (Б) Относительная интенсивность флуоресценции  $\beta$ III-тубулина в нерве на расстоянии 0.5-1 см от места повреждения в разные сроки после раздавливания, с обработкой везикул и без нее;  $n = 7$ .  $M \pm SEM$ ; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующей группой без лечения везикулами; # –  $p < 0.05$  по сравнению с интактным нервом.

Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют об эффективности ВВ в составе коллагенового геля для восстановления периферических нервов на ранних сроках (15-30 дней) после повреждения. Однако требуется более подробное исследование ВВ на предмет пролонгации нейропротекторных свойств, а также эффектов сопутствующих влияний, таких как воспалительный компонент, который является неотъемлемой частью посттравматического восстановления ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № FENW-2023-0018 (хирургические вмешательства, поведенческие тесты, гистологические и иммуногистохимические исследования) и РФФИ, грант 20-54-56028 (получение и характеристика внеклеточных везикул).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sayad Fathi S, Zaminy A.* // World J. Stem Cells. 2017. 9: 144-151.
2. *Demyanenko S.V., Pitinova M.A., Kalyuzhnaya Y.N. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. 23(15): 8583.
3. *Savastano L.E., Laurito S.R., Fitt M.R. et al.* // J. Neurosci. Methods. 2014. 227: 166-80.
4. *Dzreyan V., Eid M., Rodkin S. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. 23(8): 4451.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ

*Кулебякина М.А.<sup>1</sup>, Бутузова Д.А.<sup>1</sup>, Басалова Н.А.<sup>2</sup>, Арбатский М.С.<sup>1</sup>,  
Клычников О.И.<sup>3</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Факультет фундаментальной медицины МГУ  
имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ  
имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Патогенетическим звеном многих заболеваний является развитие и прогрессирование фиброза. Ключевой клеточный механизм этого процесса – миофибробластная дифференцировка, а основными источниками образующихся миофибробластов, как правило, служат резидентные фибробласты [1]. В ходе поиска потенциальных регуляторов миофибробластной дифференцировки обнаружено, что в модели TGF- $\beta$ 1-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты антифибротическим эффектом обладают отдельные фракции белков, секретируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (МСК), а именно фракция растворимых белковых факторов (РФ) и белков внеклеточных везикул (ВВ). Однако тотальная фракция белков кондиционированной среды (КС) МСК не оказывает выраженного эффекта на миофибробластную дифференцировку [2]. Целью настоящей работы было выявить белки, потенциально опосредующие про- и антифибротическое действие фракций секретома МСК, а также установить сигнальные пути, которые могут быть вовлечены в реализацию эффектов фракций МСК на дифференцировку фибробластов.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали кондиционированную среду иммортализованных МСК жировой ткани человека (ASC52telo, ATCC), из которой методом ультрафильтрации выделяли фракции ВВ, РФ и КС. Образцы пептидов из указанных фракций



получали методом трипсинолиза [3]. Хромато-масс-спектрометрический анализ образцов проводили на базе ЦКП «Сколково» на приборе Q Exactive HF-X. Первичные данные анализировали, используя ПО MaxQuant и Perseus. Влияние фракций секрета МСК на активацию сигнальных путей в фибробластах кожи человека в модели TGF- $\beta$ 1-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты исследовали методом ОТ-ПЦР (ПЦР в реальном времени, совмещенном с обратной транскрипцией) на транскрипционные мишени сигнальных путей TGF- $\beta$ 1 (*COL1*, *FNI*) [2,4], Notch (*HES1*, *JAG1*) [5], Wnt (*WNT3A*, *FZD8*, *CCND1*, *AXIN2*) [6] и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (*COX2*, *CXCL1*, *CXCL2*, *IL1b*, *IL6*) [7] спустя 6 часов после добавления фракций секрета МСК в концентрации 5x и рекомбинантного TGF- $\beta$ 1 в концентрации 10 нг/мл.

**Результаты.** В составе фракций секрета МСК всего идентифицировано 563 белка, из них 343 различались по представленности между фракциями в два и более раза. Мы установили, что КС обогащена относительно ВВ и РФ 107 белками, 10 из которых (F10, MIF, SDF-1 и другие), согласно данным литературы, способны активировать провоспалительный транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B. Методом ПЦР в реальном времени мы показали, что добавление КС, но не ВВ либо РФ, вызывает увеличение экспрессии генов-мишеней NF- $\kappa$ B в фибробластах кожи человека.

Кроме того, мы обнаружили, что фракции ВВ и РФ обогащены относительно фракции КС белками, способными взаимодействовать с сигнальными путями, запускаемыми TGF- $\beta$ 1, Notch, а также Wnt. Согласно данным ОТ-ПЦР, фракции ВВ и РФ, но не КС, эффективно препятствуют возрастанию экспрессии транскрипционных мишеней сигнального пути TGF- $\beta$ 1. Значимого влияния какой-либо фракции на экспрессию мишеней сигнальных путей Notch и Wnt нами не обнаружено.

**Заключение.** Используя сравнительный анализ протеомного состава фракций секрета МСК, обладающих различным эффектом на миофибробластную дифференцировку фибробластов, мы идентифицировали ряд белков, потенциально опосредующих антифибротические свойства фракций ВВ и РФ белков секрета МСК. Согласно данным ОТ-ПЦР, подавление TGF- $\beta$ 1-индуцированной дифференцировки фибробластов в миофибробласты под действием фракций ВВ и РФ может происходить за счёт более выраженного действия компонентов этих фракций на внутриклеточный сигнальный каскад, запускаемый TGF- $\beta$ 1 в фибробластах. Фракция КС обогащена набором белков, активирующих NF- $\kappa$ B, и, согласно данным ОТ-ПЦР, вызывает более выраженный воспалительный сигнальный ответ в фибробластах. Полученные данные позволяют уточнить механизм антифибротического действия секрета МСК и указывают на необходимость контроля содержания в препаратах секрета МСК компонентов, активирующих воспалительный сигнальный каскад.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ (грант № 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека»).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wynn T.A., Ramalingam T.R. // Nat. Med. 2012. 18(7): 1028-40.
2. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M. et al. // Cells. 2020. 9(5): 1272.
3. Nowacki F.C., Swain M.T., Klychnikov O.I. // Journal of extracellular vesicles. 2015. 4(1): p.28665.
4. Grigorieva O., Basalova N., Vigovskiy M. // 2023. Biomedicines. 11(3): 840.
5. Chigurupati S., Arumugam T.V., Son T.G. // PloS one. 2007. 2(11): e1167.
6. Chen S., McLean S., Carter D.E., Leask A. // Journal of cell communication and signaling. 2007. 1: 175-83.
7. Erez N., Truitt M., Olson P., Hanahan D. // Cancer cell. 2010 17(2): 135-47.

## ТИРОЗОЛ ИНДУЦИРУЕТ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Носкова Е.О.<sup>1,2</sup>, Маркова О.В.<sup>2</sup>, Кнорре Д.А.<sup>2</sup>, Галкина К.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики

МГУ имени Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского

МГУ имени. Ломоносова, Москва, Россия

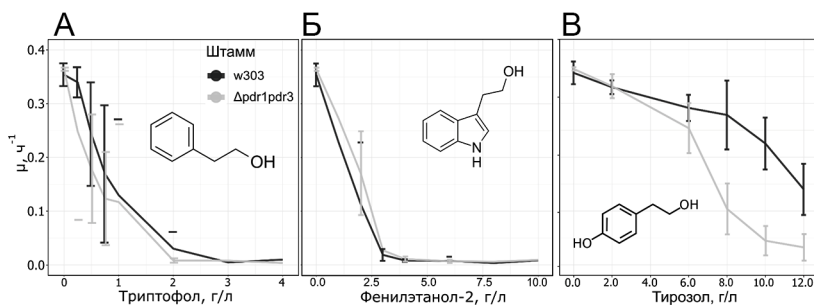
**Введение.** Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) это способность клеток противостоять действию ксенобиотиков. Большой вклад в систему множественной лекарственной устойчивости вносят два суперсемейства переносчиков с широкой субстратной специфичностью: MFS-переносчики (major facilitator superfamily) и ABC-переносчики (ATP-binding cassette) [1]. Они выкачивают из клетки метаболиты и токсины, находящиеся в цитоплазме. Как правило, активация системы МЛУ происходит в ответ на появление в клетке субстрата переносчиков, обеспечивающих работу системы МЛУ. Проникновение в клетку ксенобиотика стимулирует экспрессию генов ABC-переносчиков за счет связывания транскрипционного фактора Pdr1p и его ортолога Pdr3p с промоторными последовательностями генов этих переносчиков [2,3]. Наиболее существенный вклад в работу МЛУ клеток *Saccharomyces cerevisiae* вносят ABC-переносчики с широкой субстратной специфичностью Pdr5p, Snq2p и Yor1p [4,5].

Грибы генерируют множество видоспецифичных вторичных метаболитов, среди которых встречаются и ароматические спирты – производные метаболизма аминокислот. Некоторых их них, например,

триптофол и фенилэтанол-2, регулируют изменение жизненной формы и образовании биопленок у дрожжей рода *Candida* и *Saccharomyces* [6]. В то же время роль тирозола в жизни дрожжей остается не до конца ясной.

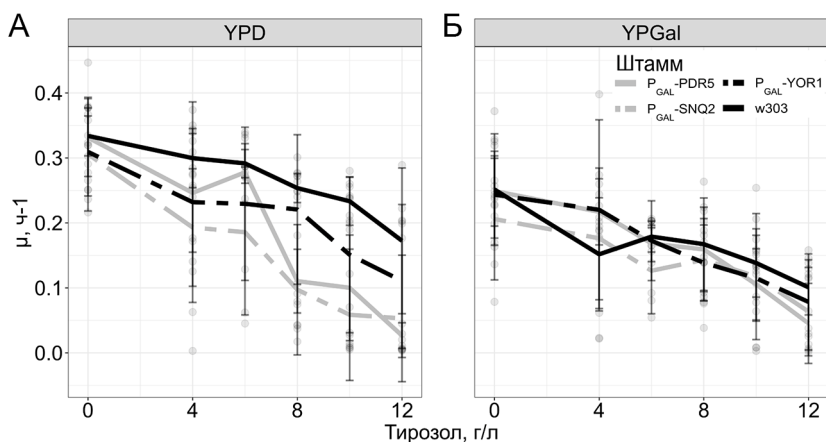
В нашей работе мы исследовали влияние ароматических спиртов – вторичных метаболитов дрожжей на активацию системы МЛЮ. В частности, мы определили, являются ли триптофол, фенилэтанол-2 и тирозол субстратами и/или индукторами генов основных переносчиков МЛЮ. Наши результаты показали, что тирозол, в отличие от фенилэтанола и триптофола, значительно снижает скорость роста клеток штамма *Δpdr1Δpdr3* с нарушенной активацией МЛЮ по сравнению с диким типом. Мы также обнаружили, что тирозол вызывает выработку клетками дрожжей ABC-переносчиков Pdr5p и Snq2p.

**Результаты и обсуждение.** Чтобы ответить на вопрос: являются ли ароматические спирты тирозол, триптофол и фенилэтанол-2 субстратами переносчиков МЛЮ, для каждого из этих соединений мы определили минимальные ингибирующие концентрации (МИК) и максимальные скорости роста дрожжей в жидкой культуре. В данных экспериментах мы использовали клетки дикого типа и клетки штамма дрожжей с нарушенной активацией МЛЮ за счет делеции генов *PDR1* и *PDR3*. В случае триптофола и фенилэтанола мы не наблюдали значимой разницы в выживаемости клеток *Δpdr1Δpdr3* по сравнению с клетками дикого типа (рис. 1А, Б). В то же время, при концентрациях тирозола 6-10 г/л мы наблюдали существенную разницу в кривых роста: в присутствии высоких концентраций тирозола клетки штамма *Δpdr1Δpdr3* росли значительно медленнее, чем клетки дикого типа (рис. 1В). Этот результат указывает на то, что тирозол может быть субстратом переносчиков МЛЮ.



**Рис. 1.** Скорости роста штаммов дикого типа и *Δpdr1Δpdr3* в присутствии различных концентраций ароматических спиртов – (А) фенилэтанола-2, (Б) триптофола, (В) тирозола. Делеция генов *PDR1* и *PDR3* приводит к инактивации системы МЛЮ и увеличивает токсичность тирозола для клеток этого штамма. Расчет производили по 5 независимым биологическим повторам экспериментов, произведенным в разные дни.

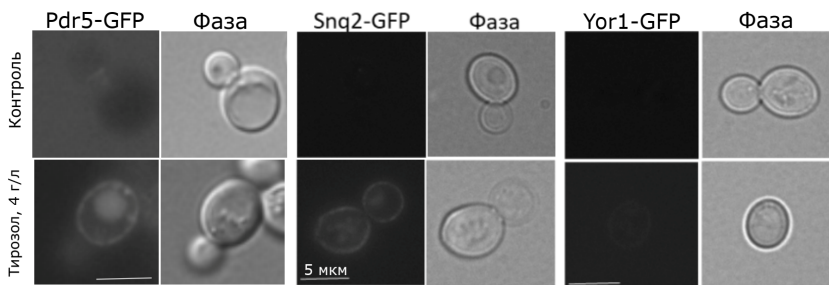
Мы предположили, что тирозол является субстратом одного из основных АВС-переносчиков с широкой субстратной специфичностью, участвующих в формировании МЛЮ. По этой причине мы измерили влияние тирозола на рост дрожжей в условиях репрессии и сверхэкспрессии генов АВС-переносчиков *PDR5*, *SNQ2* и *YOR1*. Для этого мы использовали в нашей работе штаммы, в которых данные гены находятся под регулируемым галактозным промотором  $P_{GAL}$ . Оказалось, что репрессия генов *PDR5* и *SNQ2*, но не *YOR1*, повышает чувствительность к тирозолу по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 2А). В то же время сверхэкспрессия генов основных АВС-переносчиков не увеличивала устойчивость клеток к добавке тирозола (рис. 2Б). Опираясь на эти данные, мы предположили, что тирозол может являться субстратом АВС-переносчиков Pdr5p и Snq2p.



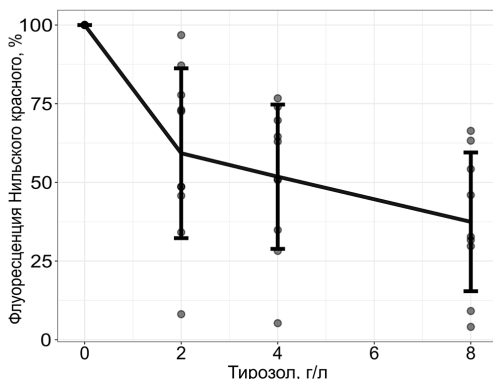
**Рис. 2.** Максимальные скорости роста штаммов  $P_{GAL}$ -*SNQ2*,  $P_{GAL}$ -*YOR1*,  $P_{GAL}$ -*PDR5* в условиях репрессии (А, питательная среда YPD без галактозы) и сверхэкспрессии (Б, питательная среда YPGal с галактозой) генов АВС-переносчиков. Репрессия генов АВС-переносчиков *PDR5* и *SNQ2* увеличивает чувствительность клеток к тирозолу. Сверхэкспрессия основных переносчиков МЛЮ не снижает устойчивость клеток к добавке тирозола.

Поскольку субстраты АВС-переносчиков часто являются индукторами экспрессии этих переносчиков, мы проверили, может ли тирозол вызывать накопление в мембране основных АВС-переносчиков. Для этого мы использовали штаммы, в которых гены АВС-переносчиков сшиты с GFP: *PDR5-GFP*, *SNQ2-GFP*, *YOR1-GFP*. С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что тирозол в концентрации 4 г/л вызывает появление сигнала GFP в плазматической мембране (ПМ) (рис. 3). Это говорит о том, что в ответ на добавление тирозола клетки вырабатывают Pdr5-GFP, который оказывается в ПМ. Тирозол в этой

концентрации также вызывал небольшое накопление в ПИМ белка Snq2-GFP, но не Yor1-GFP (рис. 3). Эти данные указывают на то, что тирозол является не только субстратом, но и индуктором экспрессии ABC-переносчиков Pdr5p и Snq2p.



**Рис. 3.** Относительные уровни ABC-транспортёров MDR Pdr5-GFP и Snq2-GFP после инкубации с тирозолом в течение 2 часов. Двойная делеция PDR1 и PDR3 ингибирует индуцированное тирозолом повышение уровней Pdr5-GFP.



**Рис. 4.** Предварительная инкубация с тирозолом (1 ч) предотвращает накопление субстрата МЛУ Нильского красного в дрожжевых клетках дикого типа.

Увеличение количества переносчиков не всегда приводит к увеличению их суммарной активности. Чтобы узнать, приводит ли добавление тирозола к увеличению активности работы системы МЛУ, мы исследовали динамику накопления в клетках флуоресцентного красителя Нильского красного (НК). Данный краситель является субстратом ABC-переносчиков и накапливается в клетках при низкой активности переносчиков МЛУ. Чем активнее система МЛУ в клетках, тем эффективнее и быстрее откачивается НК. С помощью проточной цитометрии мы измерили средний уровень флуоресценции НК в клетках,

к которым до этого был добавлен тирозол. Предынкубация клеток с тирозолом приводила к снижению флуоресценции в клетках НК по сравнению с контролем (рис. 4). Это указывает на увеличение активности МЛУ в клетках после добавления тирозола.

Таким образом, на основании полученных данных, мы сделали вывод о том, что ароматический спирт тирозол, но не триптофол и фенилэтанол-2 является субстратом АВС-переносчиков и его добавка приводит к увеличению содержания в мембране клеток белков Pdr5p и Snq2p и активации системы МЛУ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-24-00406.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Del Sorbo G., Schoonbeek H., De Waard M.A.* // Fungal Genet. Biol. 2000. 6(30): 1-15.
2. *Katzmann D.J., Burnett P.E., Golin J. et al.* // Mol. Cell. Biol. 1994. 7(14): 4653-61.
3. *Fardeau V., Lelandais G., Oldfield A. et al.* // J. Biol. Chem. 2007. 16(02): 5063-74.
4. *Wolfger H., Mammun Y. M., Kuchler K.* // Res. Microbiol. 2001. 5(3-4): 375-89.
5. *Katzmann D.J., Hallstrom T.C., Voet M. et al.* // Mol. Cell. Biol. 1995. 12(15): 6875-83.
6. *Chen H., Fink G.R.* // Genes Dev. 2006. 1(5): 1150-61.

## РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПОЧЕЧНЫМ ЭПИТЕЛИЕМ, В ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧКИ

*Певзнер И.Б.<sup>1,2</sup>, Ломакина А.К.<sup>3</sup>, Зорова Л.Д.<sup>1,2</sup>, Шевцова Ю.А.<sup>2,3</sup>,  
Горюнов К.В.<sup>2</sup>, Силачев Д.Н.<sup>1,2</sup>, Плотников Е.Ю.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>НИИ Физико-Химической Биологии имени А.Н. Белозерского МГУ  
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени акад. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Внеклеточные везикулы (EV, extracellular vesicles) – наночастицы, секретируемые всеми типами клеток и найденные в различных биологических жидкостях организма [1]. Одна из основных функций внеклеточных везикул – осуществление межклеточной коммуникации. Внеклеточные везикулы несут различные молекулы, включая нуклеиновые кислоты, белки и липиды, которые могут играть важную роль передаче сигнала и реализации биологических эффектов EV и поглощаться клетками-акцепторами как в непосредственной близости от клетки-донора, так и в отдаленных органах и тканях, переносясь через

биологические жидкости [2]. Надо отметить, что биологические функции и морфологические характеристики продуцируемых везикул зависят от типа и состояния исходной ткани или клетки в момент продукции везикул [5]. При этом среди биологических эффектов различных везикул называют регуляцию ангиогенеза, гибели и пролиферации клеток, коагуляции, модуляция иммунного ответа и воспаления [6].

Продукция везикул свойственна практически всем типам тканей, в частности недавние исследования указывают на участие EV, в особенности экзосом (EV размером от 40 до 150 нм в диаметре), секретируемых всеми сегментами нефрона, в межклеточной коммуникации в почке. EV могут обеспечивать взаимодействие между различными типами клеток в почках, а также могут опосредовать сигнализацию между почками и другими органами при физиологических и патологических состояниях [3,4]. Роль EV в почечной коммуникации связана не только с физиологическими процессами (нефрогенез, регуляция почечного кровотока), но и с патогенезом и прогрессированием почечных заболеваний, таких как острая почечная недостаточность и фиброз, нефролитиаз, отторжение почечного трансплантата и рак почки [7, 8]. Показано участие EV в процессах регенерации почки, но большинство подобных исследований сосредоточены на роли в этих процессах экзосом стволовых клеток. Выявлено, что EV из мезенхимальных стволовых клеток облегчают острое почечное повреждение, индуцируя регенерацию клеток почечного эпителия и ангиогенез, а также подавляя апоптоз, окислительный стресс и воспаление при ишемии-реперфузии [9,10].

EV могут использоваться и в диагностике заболеваний: при патологических состояниях EV изменяют состав переносимого груза, опосредуя или подавляя последствия повреждения. Таким образом, EV с их уникальными белками и РНК являются перспективными биомаркерами широкого спектра заболеваний и патологий [11]. В отношении диагностики заболеваний почек изучаются везикулы, выделяемые с мочой. Поскольку почечные клетки активно выделяют везикулы в мочу, такие везикулы могут стать перспективными неинвазивными биомаркерами заболеваний почек [1].

Необходимо принимать во внимание, что эпителиальные клетки почечных канальцев могут являться источником везикул и одновременно мишенью их действия [12], локализуясь в зоне повреждения почек. Однако, все еще остается неясным, какое влияние EV, продуцируемые клетками канальцев оказывают на другие клетки почки, и как этот ответ меняется при повреждении.

Целью данной работы является изучение влияния внеклеточных везикул, полученных от клеток почечных канальцев в физиологических и патологических условиях, на жизнеспособность клеток эпителия почки в модели кислородно-глюкозной депривации (КГД).

**Материалы и методы.** В работе использовали первичную культуру эпителия почечных канальцев (ЭПК). Стерильно выделенные почки крыс возраста до 14 дней измельчались и инкубировались с 1 мл 0.125% коллагеназы II типа, приготовленной на DMEM/F12, в течение 15 минут. Крупные кусочки осаждались, супернатант отделялся. Клетки осаждались из супернатанта отстаиванием в течение 10 минут. Клетки ЭПК выращивали на питательной среде DMEM/F12 (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera), 2% незаменимых аминокислот, 1% витаминов, 1% L-глутамина.

Для выделения везикул клетки растили 2 дня в питательной среде, затем ее сменяли и через сутки удаляли. Клетки промывали DPBS (ПанЭко) и заменяли среду на отцентрифугированные при 108000 g 90 минут безвезикулярные среду того же состава (контроль) или DPBS (с последующим моделированием острого повреждения при КГД). Для моделирования КГД клетки инкубировали в DPBS при 1% O<sub>2</sub>, 0% CO<sub>2</sub> в течение 18 часов. Через 18 часов кондиционированные среды собирались в стерильные пробирки для выделения везикул. Собранная с клеток среда центрифугировалась при 400 g 10 минут. Отобранный супернатант центрифугировали при 10000 g 30 минут. Полученный супернатант вновь центрифугировали для высаживания везикул при 108000 g 90 минут. Полученные осадки везикул ресуспендировались в 100 мкл PBS Gibco и замораживались до дальнейшего использования.

Культуры для изучения влияния на них везикул выделялись вышеуказанным способом, рассеивались на 96-луночные планшеты в 100 мкл питательной среды на лунку. Через 2 дня меняли среду на свежую с добавлением ранее полученных от других культур везикул в подобранных концентрациях. Клетки инкубировали с везикулами 24 часа, затем среду сливали, в контрольный планшет наливали полноценную питательную среду, а во второй планшет заливали DPBS с последующим моделированием КГД. Через 18 часов проводили МТТ-тест для оценки жизнеспособности клеток.

**Результаты и обсуждение.** В работе проводили выделение внеклеточных везикул из культуральной среды от интактных клеток эпителия почечных канальцев и клеток, подвергшихся КГД. Полученные везикулы от контрольных или поврежденных клеток добавляли к культурам ЭПК и изучали их влияние на жизнеспособность клеток в норме и при патологии в модели КГД.

С помощью анализа трекинга наночастиц (NTA) было установлено, что везикулярный осадок после ультрацентрифугирования культуральной среды от клеток ЭПК содержит около 90% частиц с диаметром меньше 200 нм, то есть с характерным для экзосом размером. Иммуноблоттинг полученных везикул выявил положительное окрашивание антителами к специфическому маркеру экзосом TSG101. По данным NTA,



концентрация EV от интактных клеток в среднем составляла  $0.23 \times 10^{11}$  частиц/мл, а EV от клеток после КГД –  $0.04 \times 10^{11}$ . Ранее нами были подобраны концентрации везикул, продуцируемых мезенхимальными стромальными клетками, оказывающие выраженное действие на смешанную нейро-астроглиальную культуру [13]. Основываясь на этих результатах, в данной работе было решено использовать для воздействия на клетки концентрацию  $2.4 \times 10^8$  частиц/мл (обозначено как 1x разведение), и были подготовлены соответствующие разведения исходного везикулярного осадка.

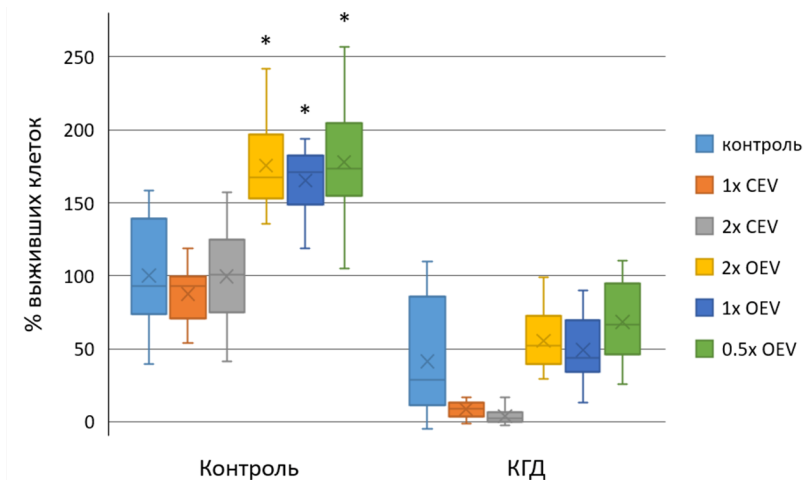
Культуры для изучения влияния на них везикул инкубировали с EV от контрольной культуры ЭПК (CEV) и EV от культуры ЭПК, подвергшейся КГД (OEV) в разведениях 1x, 2x, 0.5x. Клетки инкубировали с везикулами 24 часа, затем на одном планшете моделировали острое повреждение КГД в течение 18 ч с последующим проведением стандартного МТТ-теста для оценки жизнеспособности, второй планшет выступал в качестве контроля.

Кислородно-глюкозная депривация оказывала значительное повреждающее действие на клетки ЭПК, вызывая снижение количества жизнеспособных клеток примерно до 30% от контроля.

Наши эксперименты показали, что экзосомы, полученные от интактных клеток (CEV), уменьшают выживание клеток ЭПК после КГД по сравнению с клетками, которые предварительно не культивировались с везикулами. Напротив, экзосомы, продуцируемые поврежденными клетками (OEV), увеличивали выживание клеток после КГД.

Различное влияние оказали разные типы полученных везикул и на клетки, культивируемые в нормальных условиях. Выявлено, что EV от неповрежденных клеток практически не влияли на жизнеспособность клеток ЭПК, в то время как экзосомы от поврежденных клеток значимо увеличивали ее (рис. 1).

Сигнальными молекулами, переносимыми с помощью EV могут выступать белки, короткие пептиды, разные виды нуклеиновых кислот. В настоящее время многие исследования сосредоточены на роли РНК-груза, переносимого EV. Имеются убедительные доказательства того, что РНК-компонент внеклеточных везикул может изменять экспрессию и функцию генов реципиентных клеток [2]. Пулы РНК в EV представлены различными кодирующими белок транскриптами (мРНК) и многими типами некодирующих РНК, включая микроРНК (miR), длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, малые ядрышковые РНК, малые ядерные РНК, транспортные РНК, рибосомальные РНК и piwi-взаимодействующие РНК [14]. Большинство исследований связывают сигнальную роль EV в отношении заболеваний почек в основном с содержанием в них мРНК и miR. Для микроРНК показано, что они могут влиять на выживаемость клеток [15]. Роль таких молекул в обнаруженных нами эффектах еще предстоит выяснить.



**Рис. 1.** Влияние везикул, полученных от интактных клеток (CEV) и от поврежденных клеток после КГД (OEV), на жизнеспособность клеток почки в норме и при КГД. 1x концентрация везикул =  $2.4 \times 10^8$  частиц/мл. \* –  $p = 0.01$ .

Сигнальными молекулами, переносимыми с помощью EV могут выступать белки, короткие пептиды, разные виды нуклеиновых кислот. В настоящее время многие исследования сосредоточены на роли РНК-груза, переносимого EV. Имеются убедительные доказательства того, что РНК-компонент внеклеточных везикул может изменять экспрессию и функцию генов реципиентных клеток [2]. Пулы РНК в EV представлены различными кодирующими белок транскриптами (мРНК) и многими типами некодирующих РНК, включая микроРНК (miR), длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, малые ядрышковые РНК, малые ядерные РНК, транспортные РНК, рибосомальные РНК и *piwi*-взаимодействующие РНК [14]. Большинство исследований связывают сигнальную роль EV в отношении заболеваний почек в основном с содержанием в них мРНК и miR. Для микроРНК показано, что они могут влиять на выживаемость клеток [15]. Роль таких молекул в обнаруженных нами эффектах еще предстоит выяснить.

Таким образом, в настоящей работе показано разнонаправленное влияние везикул, продуцируемых клетками почечного эпителия в нормальных и патологических условиях, на жизнеспособность культивируемых клеток почки в норме и после ишемического повреждения.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-30009.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ranghino A., Dimuccio V., Papadimitriou E., Bussolati B. // Clin. Kidney J. 2015. 8(1): 23-30.
2. O'Brien K., Breyne K., Ughetto S. et al. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. 21(10): 585-606.
3. Zhang W., Zhou X., Zhang H. et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2016. 311(5): F844-51.
4. Zhou X., Zhang W., Yao Q. et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2017. 312(6): F963-70.
5. Gurunathan S., Kang M.H., Jeyaraj M. et al. // Cells. 2019. 8(4): 307.
6. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. // Blood Rev. 2013. 27(1): 31-9.
7. Rigalli J.P., Barros E.R., Sommers V. et al. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. 8: 244
8. Pomatto M.A.C., Gai C., Bussolati B., Camussi G. // Front. Mol. Biosci. 2017. 4: 37.
9. Yu L., Liu S., Wang C. et al. // Stem Cell Res. Ther. 2021. 12(1): 379.
10. Birtwistle L., Chen X.M., Pollock C. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(12): 6596.
11. Weber B., Franz N., Marzi I. et al. // Eur. J. Trauma Emerg. Surg. 2021. 1-20.
12. Liu B.C., Tang T.T., Lv L.L., Lan H.Y. // Kidney Int. 2018. 93(3): 568-79.
13. Turovsky E.A., Golovicheva V.V., Varlamova E.G. et al. // Int. J. Biol. Sci. 2022. 18(14): 5345-68.
14. Kim K.M., Abdelmohsen K., Mustapic M. et al. // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2017. 8(4): 10.1002/wrna.1413.
15. Meldolesi J. // Curr Biol. 2018. 28(8): R435-44.

## РЕГУЛЯЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОГЛИИ И МАКРОФАГОВ И АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИГНАЛОВ ЭКЗОСОМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Ратушняк М.Г., Шапошникова Д.А., Высоцкая О.В.*

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

**Введение.** Экзосомы – экстраклеточные наноразмерные везикулы (30-150 нм), окруженные двуслойной мембраной. Они образуются в клетках в результате слияния поздних эндосом с лизосомальными частицами и высвобождаются впоследствии во внеклеточную среду. Экзосомы содержат многочисленные белковые молекулы, включая факторы роста, нуклеиновые кислоты, регуляторные микроРНК, цитокины и рецепторы, которые присутствуют на поверхности их мембраны и могут участвовать в межклеточной передаче сигналов как в результате взаимодействия рецептор-лиганд, так и в результате слияния с клетками-мишенями и последующего внутриклеточного высвобождения регуляторных молекул [1]. Данные исследований в области

регенеративной медицины о способности стволовых клеток (СК) стимулировать процессы регенерации благодаря секреции широкого спектра регуляторных молекул делают актуальным исследование потенциала экзосом СК для восстановления клеток и функций мозга, сниженных при нейродегенеративных заболеваниях, травме, инсульте и при отдаленных осложнениях после облучения мозга при лучевой терапии опухолей в области головы и шеи [2]. Все эти состояния обусловлены активацией клеток микроглии и астроцитов, сопровождающейся повышением секреции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и хемокинов, что приводит к развитию хронического нейровоспаления, повреждению нейронов и снижению нейрогенеза в результате повреждения нейральных стволовых клеток (НСК) [3]. Целью работы явилось изучение возможности регуляции уровня провоспалительной реакции клеток микроглии и макрофагов и регуляции активности пролиферации облученных НСК с помощью экзосом НСК и мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

**Материалы и методы.** Выделение и культивирование НСК из головного мозга мыши проводили, как описано в статье [4]. НСК на 16-20-м пассаже культивировали в виде нейросфер, высевали по  $5 \times 10^5$  клеток в чашки Петри диаметром 6 см, культуральную среду собирали через 48 часов.

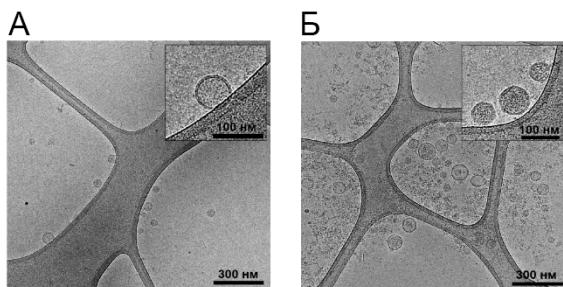
МСК выделяли из жировой ткани мышечной линии C57Bl/6 в возрасте 2 месяцев, как описано ранее [5]. Клетки микроглии мышечной линии SIM-A9 культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 5% инактивированной лошадиной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Для сбора культуральной среды, кондиционированной МСК, использовали среду  $\alpha$ MEM с 5% фетальной бычьей сыворотки, предварительно очищенной от экзосом двойным ультрацентрифугированием при  $110000 \times g$  в течение 2 часов при  $+4^\circ C$ . Культуральную среду, кондиционированную НСК и МСК, использовали для выделения экзосом, которое осуществляли с помощью дифференциального ультрацентрифугирования [6]. Средний размер экзосом определяли методом динамического светорассеяния на анализаторе размера частиц и дзета-потенциала Malvern Zetasizer Nano ZSP.

Морфологию экзосом анализировали при использовании криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ). Исследование маркеров экзосом проводили с помощью проточной цитометрии, как описано ранее [6], с использованием антител к маркерам экзосом CD9, CD63, TSG101 на проточном цитофлуориметре BD FACSAria Fusion. Окрашивание экзосом для исследования их локализации в клетках выполняли с использованием флуоресцентного красителя PKH26. Меченные этим красителем экзосомы ультрацентрифугировали

при 110000×g в течение 60 минут, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и снова ультрацентрифугировали. Анализ уровня экспрессии мРНК генов цитокинов в клетках микроглии, в селезенке и гиппокампе мышей проводили с помощью ОТ-ПЦР.

**Результаты.** Морфология полученных экзосом НСК и МСК по данным крио-ПЭМ показана на рис. 1. Показано, что полученные частицы имеют характерную округлую форму и хорошо различимую двойную мембрану.

Остальные параметры выделенных экзосом СК представлены в табл. 1. Показано, что по данным динамического светорассеяния средний размер экзосом НСК составил  $50.8 \pm 0.1$  нм. По данным проточной цитометрии практически все экзосомы были положительны по обоим маркерам CD9/CD63. Экзосомы МСК по данным динамического светорассеяния имели средний размер  $68.1 \pm 3.8$  нм. Все экзосомы МСК также были положительны по обоим маркерам CD9/CD63.

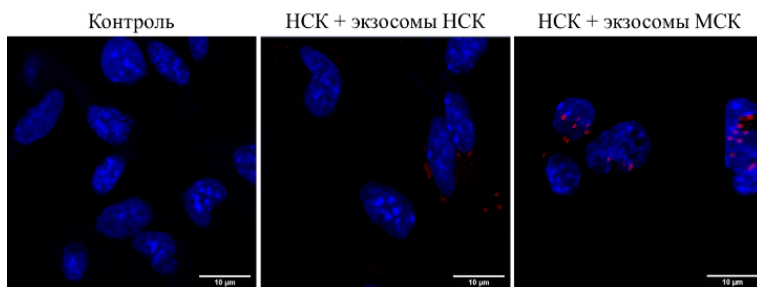


**Рис. 1.** Морфология экзосом, выделенных из среды, кондиционированной НСК (А) и МСК (Б).

**Табл. 1.**

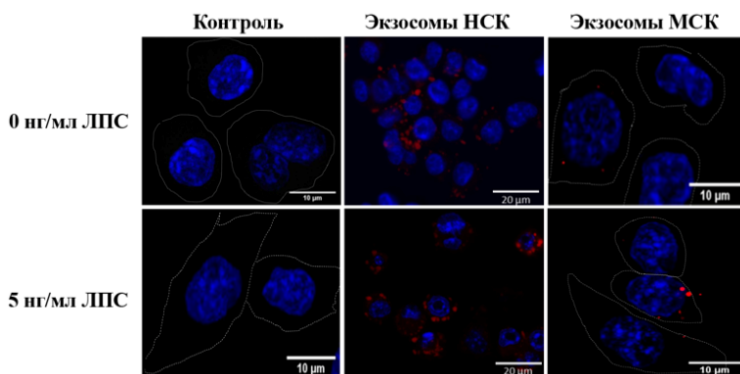
Показатель		Экзосомы НСК	Экзосомы МСК
Количество клеток		84 млн	50 млн
Объем кондиционированной среды		75 мл	250 мл
Количество белка в препарате		378 мкг/мл	1.5 мг/мл
Присутствие маркеров	CD9	95.4%	99.9%
	CD63	95.4%	99.9%
	TSG101	97.0%	97.8%
Размер экзосом		$50.75 \pm 0.1$ нм	$68.06 \pm 3.8$ нм
Морфология экзосом		округлая форма, мембрана хорошо различима	округлая форма, мембрана хорошо различима
Радиозащитная активность <i>in vitro</i>		показана	показана

Для исследования проникновения экзосом в НСК и в клетки микроглии линии SIM-A9 предварительно проводили окрашивание экзосом флуоресцентным красителем PKH26. Показано (рис. 2), что экзосомы, выделенные из культуральной среды, кондиционированной НСК и МСК, способны проникать в НСК и накапливаться в цитоплазме в перинуклеарной зоне этих клеток. Экзосомы МСК обнаруживали и в ядрах клеток.



**Рис. 2.** Локализация экзосом НСК и МСК в культивируемых НСК после инкубации в течение 24 часов. Контроль НСК (без экзосом); НСК после культивирования с экзосомами НСК; НСК после культивирования с экзосомами МСК. Концентрация экзосом – 5 мкг/мл.

Одновременно исследовали накопление экзосом СК контрольными и активированными липополисахаридом (ЛПС) клетками микроглии мыши линии SIM-A9 (рис. 3).



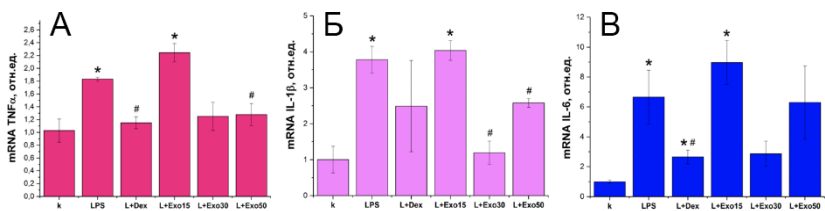
**Рис. 3.** Накопление экзосом НСК (5 мкг/мл) и МСК (5 мкг/мл) в клетках микроглии линии SIM-A9. Пунктирными линиями показаны границы клеток.

Показано, что экзосомы обоих типов СК накапливались в цитоплазме в перинуклеарной зоне этих клеток. Накопление экзосом НСК было более интенсивным. Накопление экзосом МСК было более интенсивным в клетках микроглии, активированных ЛПС.

При изучении противовоспалительной активности экзосом НСК и МСК в отношении клеток микроглии линии SIM-A9, активированных ЛПС, клетки микроглии обрабатывали ЛПС в концентрации 5 нг/мл в течение 4 часов. После отмывания ЛПС к ним добавляли экзосомы НСК в концентрации: 0.5-15 мкг/мл по белку. Через 24 часа для последующего ПЦР-анализа экспрессии генов цитокинов клетки микроглии собирали и замораживали до исследования. Показано, что уровень экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов значительно повышался после обработки клеток микроглии линии SIM-A9 ЛПС в концентрации 5 нг/мл. Он был принят за 100% при оценке влияния препаратов экзосом. Добавление к активированным клеткам микроглии экзосом в концентрации 5, 10 и 15 мкг/мл по белку приводило к повышению экспрессии гена TNF $\alpha$ , и только при концентрации 5 мкг/мл по белку имело место повышение экспрессии генов цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6. Повышение экспрессии провоспалительных цитокинов в клетках микроглии линии SIM-A9 под влиянием высоких концентраций экзосом НСК может свидетельствовать об участии экзосом НСК в активации клеток иммунной системы мозга.

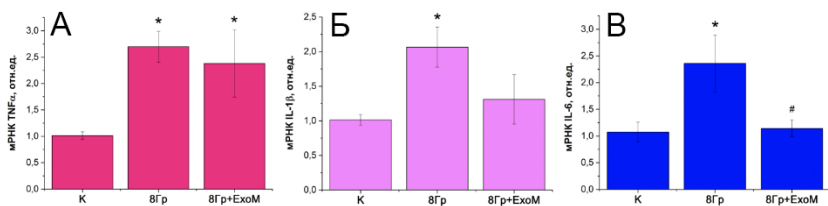
Показано, что экзосомы МСК, в отличие от экзосом НСК, не активировали экспрессию генов провоспалительных цитокинов клетками микроглии, а напротив, при их добавлении к активированным клеткам микроглии в концентрациях 1, 10 и 15 мкг/мл обнаружено достоверное снижение экспрессии генов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, которое, однако, было достоверно выше контрольного уровня. Влияние экзосом на уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов не зависело от их концентрации в указанном диапазоне.

Противовоспалительная активность экзосом МСК, соизмеримая с активностью дексаметазона, показана и в экспериментах на мышцах линии C57BL/6. Контрольным мышам внутривенно вводили ФСБ, мышам из экспериментальных групп – ЛПС (50 мкг); или в одном шприце ЛПС (50 мкг) и дексаметазон (30 мкг); или ЛПС (50 мкг) и экзосомы МСК (15, 30 и 50 мкг по белку) в растворе ФСБ. Через 3 часа извлекали селезенку и в клетках селезенки оценивали уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 с помощью ОТ-ПЦР. Показано, что внутривенное введение экзосом МСК приводило к статистически значимому снижению повышенных при введении ЛПС уровней цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 до контрольных значений (рис. 4).



**Рис. 4.** Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (Б) и IL-6 (В) в селезенке мышей после внутривенного введения экзосом МСК в концентрации 15, 30 и 50 мкг/мышь по белку в сравнении с действием дексаметазона в концентрации 30 мкг/мышь. К – контроль; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0.05$ ; # – отличия статистически значимы в сравнении с группой ЛПС,  $p < 0.05$ .

Интраназальное введение экзосом в дозе 5 мкг (по белку)/мышь в течение 4 недель, начиная через 48 часов после гамма-облучения головы в дозе 8 Гр, приводило к снижению уровней экспрессии провоспалительных цитокинов, кроме TNF $\alpha$ , до уровня контроля, что свидетельствует о частичном снижении радиационно-индуцированного нейровоспаления у облученных мышей в этих условиях (рис. 5).



**Рис. 5.** Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (Б) и IL-6 (В) в гиппокампе контрольных и облученных мышей после интраназального введения экзосом МСК в дозе 5 мкг (по белку)/мышь. К – контроль; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0.05$ ; # – отличия статистически значимы в сравнении с группой 8 Гр,  $p < 0.05$ .

Таким образом, экзосомы МСК обладали противовоспалительной активностью как в модельных экспериментах с использованием культивируемых клеток микроглии линии SIM-A9, так и на модели оценки противовоспалительной активности экзосом в экспериментах *in vivo*. Однако в экспериментах *in vivo* при использовании модели пострadiационного развития воспаления в отдаленный период после облучения головы мышей в дозе 8 Гр уровень нейровоспаления, оцениваемый по уровню экспрессии генов провоспалительных цитокинов, удалось снизить лишь частично (рис. 5).

Необходимо дальнейшее исследование механизмов действия экзосом СК в мозге для оптимизации режима терапевтического использования препаратов экзосом.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Forsberg M., Kink J., Hematti P., Capitini C. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. 8: 665.
2. Yang L., Yang J., Li G. et al. // *Mol. Neurobiol.* 2017. 54(2): 1022-32.
3. Raber J., Rola R., LeFevour A. et al. // *Radiation Res.* 2004. 162(1): 39-47.
4. Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П. и др. // *Цитология.* 2019. 61(10): 806-16.
5. Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В. и др. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2019. 59(2): 237-48.
6. Ратушняк М.Г., Журник А.С., Смирнова О.Д. и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2022. (4) :261-8.

### ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИНДУКЦИЮ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ И ЗАЩИТУ КЛЕТОК ГИППОКАМПА ОТ ИШЕМИИ

*Туровский Е.А.<sup>1</sup>, Варламова Е.Г.<sup>1</sup>, Буров А.А.<sup>2</sup>, Горюнов К.В.<sup>2</sup>,  
Шевцова Ю.А.<sup>2</sup>, Силачев Д.Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства гинекологии и перинатологии имени В.А. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

**Введение.** Внеклеточные везикулы (EVs) – это мембранооболоченные частицы, которые выделяются клетками и содержат разнообразные биологически активные грузы, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Они играют важную роль в межклеточной коммуникации и могут модулировать несколько биологических процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и иммунная регуляция клеток. Существует три основных типа везикул, которые различаются по их биогенезу и размеру: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Экзосомы – это небольшие везикулы с размером от 30 до 150<sup>o</sup>нм, которые происходят из эндоцитарной мембранной системы. Микровезикулы или эктосомы – это более крупные везикулы с размером от 100 до 1000<sup>o</sup>нм, которые образуются из плазматической мембраны клетки. Апоптотические тела – это самые крупные везикулы с размером от 1 до 5 мкм, которые продуцируются клетками, подвергающимися апоптозу. Мультипотетные

мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) также секретируют EVs, которые играют важную роль в реализации терапевтических эффектов. EVs, полученные от ММСК, стали многообещающим терапевтическим инструментом для лечения различных патологических состояний, включая неврологические и иммунологические заболевания, а также дефекты костей и хрящей благодаря их способности доставлять биоактивные грузы к целевым клеткам. В этом контексте понимание биогенеза, состава и функций везикул, полученных от ММСК, является важным для полного использования их терапевтического потенциала.

Один из механизмов, которым EVs оказывают нейропротекторное действие, заключается в передаче биологически активных молекул, таких как микроРНК (miRNA) и белки. Ранее нами было показано, что PI3K/AKT сигнальный путь является одним из основных путей в ММСК-EVs-зависимой защите нейронов, подвергающихся ишемическому стрессу. Протеомный анализ ММСК-EVs выявил обогащение данного сигнального пути [1].

Мы предположили, что EVs могут оказывать preconditionирующие эффекты на клетки. Preconditionирование относится к процессу, посредством которого клетки подвергаются воздействию сублетальных стрессоров, таких как гипоксия или ишемия, что может привести к индукции защитных механизмов.

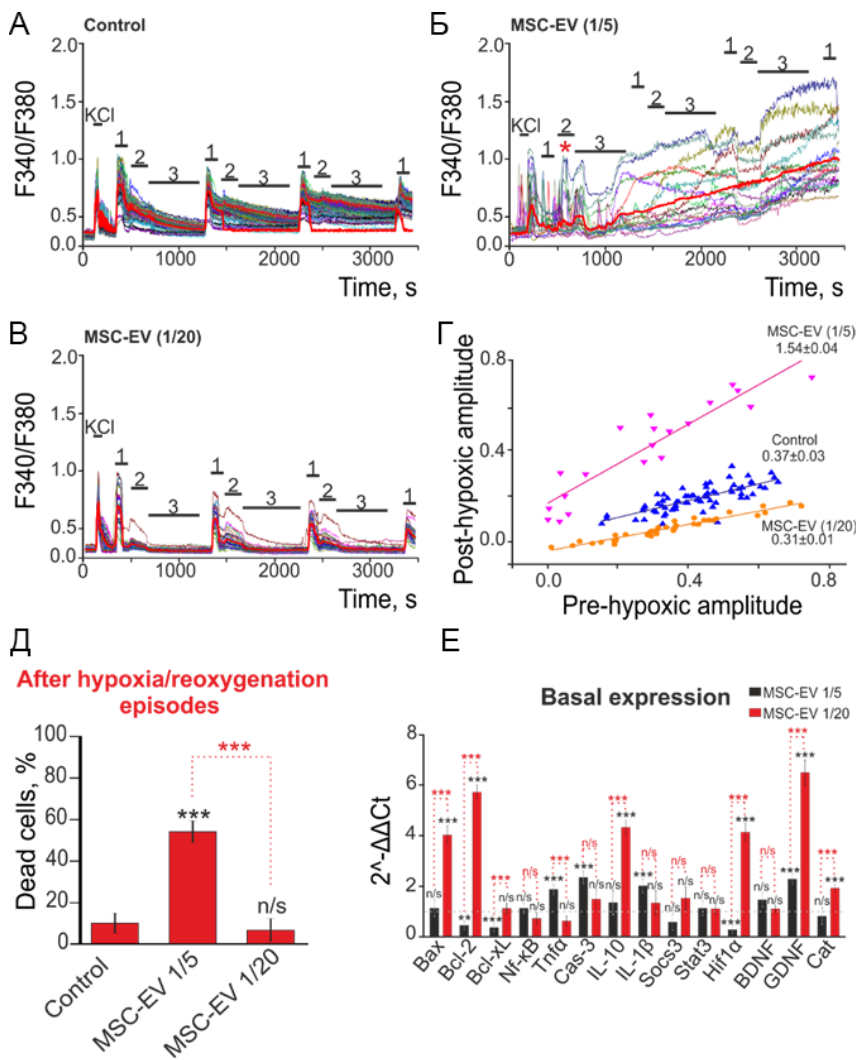
Целью исследования являлось изучить, как экзосомы, полученные из мезенхимальных стромальных клеток, могут индуцировать гипоксическое preconditionирование и защищать клетки гиппокампа от ишемии, а также определить, является ли этот эффект дозозависимым.

**Материалы и методы.** EVs были выделены из кондиционированной культуральной среды ММСК методом дифференциального центрифугирования согласно рекомендациям MISEV 2018, как описано в [1].

Эксперименты проводили на клеточных культурах гиппокампа, полученных из новорожденных крыс Sprague Dawley, которые культивировали до 12 дня *in vitro*. Для изучения эффектов ММСК-EVs на механизмы preconditionирования нейронов, клетки гиппокампа в течение 24-х часов инкубировали с различными концентрациями ММСК-EVs, а далее проводили эксперименты по моделированию эпизодов гипоксии/реоксигенации. Клеткам добавляли 150<sup>o</sup>мкМ NMDA в безмагниевой среде (30 сек) и отмывали, после чего создавали эпизод гипоксии (3 минуты) и период реоксигенации (10 минут) после чего вновь производилась кратковременная аппликация NMDA. Эпизоды гипоксии/реоксигенации и аппликации NMDA производили трижды. По изменению амплитуд Ca<sup>2+</sup>-сигналов нейронов на NMDA оценивали индукцию гипоксического preconditionирования. Условия кислородно-глюкозной депривации (OGD) производили с помощью добавления к

клеткам безглюкозной среды Хенкса из которой был вытеснен кислород с помощью продувки аргоном. Во время 40 минутной OGD производился постоянный поддув аргона в камеру с клетками и регистрация динамики  $[Ca^{2+}]_i$ . Эксперименты по регистрации уровня цитозольного кальция в клетках, нагруженных флуоресцентным кальциевым зондом Fura-2, проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M. Моделирование условий гипоксии/реоксигенации и кислородно-глюкозной депривации (OGD) производилось в соответствии с описанной ранее методикой [2]. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора реагентов Mag Jet RNA (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 5°мкл qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия), 1 мкл (0.2 мкМ) каждого праймера, 17 мкл воды, 1 мкл кДНК. Амплификацию проводили в 48-лучном амплификаторе Dtlite5 (ДНК-Технология, Россия). Экспрессию генов нормировали по контрольному гену *GAPDH*, кодирующему глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Результаты рассчитывали в соответствии со стандартным методом.

**Результаты.** Ранее нами было показано, что повторяющиеся кратковременные эпизоды гипоксии, сменяющиеся периодами реоксигенации, вызывают появление феномена гипоксического прекодиционирования в нейронах гиппокампа, проявлением которого является последовательное подавление эпизодами гипоксии амплитуд  $Ca^{2+}$ -ответов нейронов на активацию ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов селективным агонистом [3]. Для исследования влияния двух концентраций ММСК-EVs на эффект прекодиционирования нейронов регистрировали изменение концентрации цитозольного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в ответ на кратковременные аппликации активатора NMDA-рецепторов - NMDA, 10°мкМ в безмагниевой среде (обозначение 1), эпизоды кратковременной гипоксии (обозначение 2) и 10-ти минутные периоды реоксигенации (обозначение 3). На рис. 1А представлены  $Ca^{2+}$ -ответы контрольных нейронов гиппокампа крыс, которые не подвергались предварительному воздействию ММСК-EVs. Видно, что в среднем, амплитуда  $Ca^{2+}$ -сигналов на аппликацию NMDA снижалась после каждого эпизода гипоксии/реоксигенации, что подтверждает коэффициент (к/ф) угла наклона прямой, аппроксимирующей амплитуды  $Ca^{2+}$ -сигналов (АКО) после трех эпизодов гипоксии/реоксигенации (рис. 1Г – Control), который составляет  $0.37 \pm 0.03$ . Предварительная инкубация нейронов гиппокампа с ММСК-EVs в концентрации 1/5 (рис. 1Б) в течение 24-х часов приводила к снижению числа клеток, реагирующих на добавку NMDA, а также генерации  $Ca^{2+}$ -импульсов во время гипоксии (рис. 1Б – обозначено звездочкой) и глобальным повышением  $[Ca^{2+}]_i$  в части нейронов в период реоксигенации. Поскольку после инкубации клеток с



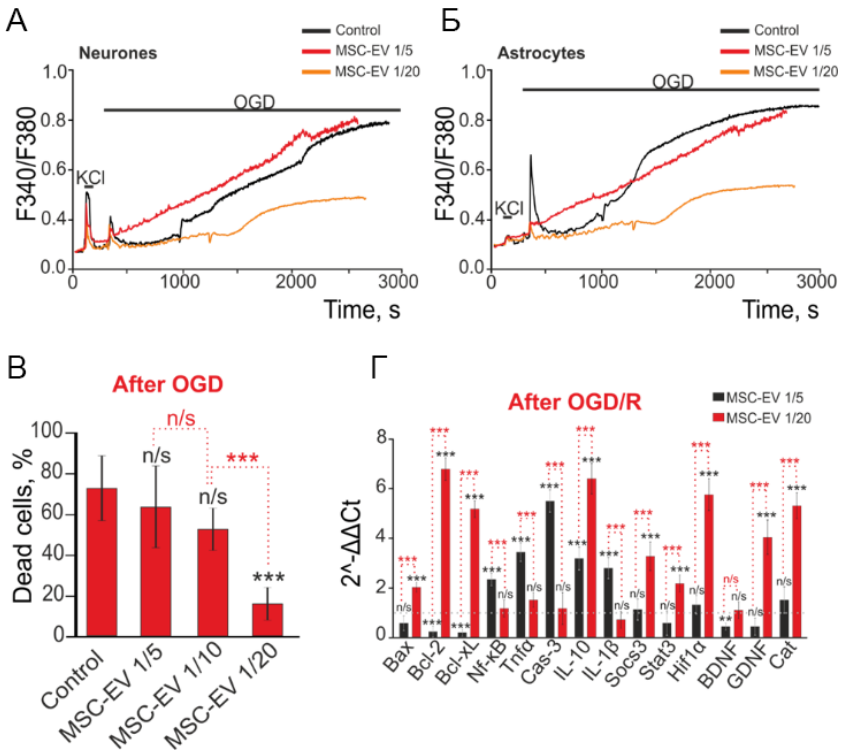
**Рис. 1.** Дозозависимый эффект 24-х часовой преинкубации клеток гиппокампа с ММСК-EVs на индукцию феномена гипоксического preconditionирования (А-Г), жизнеспособность клеток (Д) и экспрессию генов, кодирующих белки-регуляторы клеточной гибели (Е). А-В –  $Ca^{2+}$ -сигналы нейронов гиппокампа на добавление 35°mM KCl, повторяющиеся кратковременные аппликации 10 мкМ NMDA в безмагниевой среде (1), эпизоды кратковременной (3 минуты) гипоксии (2) и периоды реоксигенации длительностью 10 минут (3) в контроле (А), после 24-х

часового воздействия ММСК-EVs в концентрации 1/5 (Б) и 1/20 (В). Г – Зависимость амплитуды  $Ca^{2+}$ -сигналов нейронов гиппокампа на аппликацию NMDA в безмагниевой среде после 3-х эпизодов кратковременной гипоксии (ось Y) от предгипоксической амплитуды  $Ca^{2+}$ -сигналов (ось X). Уравнение для линейной функции:  $y = a + b \times x$ . Д – Эффект ММСК-EVs на гибель клеток гиппокампа после эпизодов гипоксии/реоксигенации. Е – Эффект 24-х часовой инкубации клеток с MSC-EV на базовую экспрессию генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза, воспаления и нейротрофические факторы.

ММСК-EVs (1/5) после трех эпизодов гипоксии/реоксигенации практически не отвечал на аппликацию NMDA ни один из нейронов, то на рис. 1Г за амплитуду  $Ca^{2+}$ -сигнала были приняты максимальные значения флуоресценции Fura-2 в конце эксперимента минус базовый уровень флуоресценции до эпизодов гипоксии/реоксигенации. Так, оказалось, что к/ф наклона линейной аппроксимации для экспериментальной группы ММСК-EVs (1/5) составил  $1.54 \pm 0.04$ , что говорит о токсических эффектах в нейронах. Действительно, окраска данных клеточных культур с помощью йодида пропидия после проведения экспериментов показало гибель до 60% клеток в поле зрения микроскопа (рис. 1Д).

После 24-х часовой инкубации нейронов гиппокампа с ММСК-EVs в разведении 1/20 происходило подавление АКО на аппликацию NMDA после эпизодов гипоксии/реоксигенации (рис. 1В), а к/ф угла наклона прямой, аппроксимирующей эти АКО после трех эпизодов гипоксии/реоксигенации составил  $0.31 \pm 0.01$  (рис. 1Г). Т.е. к/ф наклона линейной аппроксимации в экспериментальной группе ММСК-EVs (1/20  $2.4 \times 10^8$  частиц/мл) меньше, по сравнению с контролем, что может говорить об усилении эффекта прекондиционирования везикулами ММСК при их использовании в разведении 1/20. Гибель клеток после экспериментов по моделированию эпизодов гипоксии/реоксигенации в контрольной группе и группе ММСК-EVs (1/20) составляла не более 10% клеток (рис. 1Д).

Анализ базовой экспрессии мРНК генов после 24-х часовой инкубации с ММСК-EVs в концентрации 1/5 показал, что повышается экспрессия провоспалительных генов *Tnfa*, *Cas-3*, происходящих на фоне подавления экспрессии антиапоптотических генов и ключевых факторов транскрипции, в том числе *Nif1a* (рис. 1Е – черные столбцы). Однако, использование ММСК-EVs в разведении 1/20 приводило к противоположному эффекту на базовый уровень мРНК исследованных генов – происходило повышение экспрессии большинства генов, кодирующих протекторные белки (рис. 1Е – красные столбцы).



**Рис. 2.** Эффект ММСК-EVs на OGD-индуцированные  $Ca^{2+}$ -сигналы в нейронах (А) и астроцитах (Б) гиппокампа, клеточную гибель (В) и экспрессию генов, кодирующих белки-регуляторы клеточной гибели, после 40 минут OGD и 24-х часов реоксигенации (Г). А, В –  $Ca^{2+}$ -сигналы нейронов (А) и астроцитов (Б) на аппликацию 35<sup>o</sup>ММ KCl и OGD в течение 40 минут в зависимости от концентрации ММСК-EVs, с которой клетки инкубировали в течение 24-х часов. В – Процент клеток, погибших после 40 минут OGD. Г – Эффект 24-х часовой инкубации клеток с ММСК-EVs на OGD/R-индуцированную экспрессию генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза, воспаления и нейротрофические факторы. За 1 (пунктирная прямая) принят уровень экспрессии в контрольных клетках после воздействия OGD/R.

Ишемия-подобные условия (OGD) вызывают двухфазные  $Ca^{2+}$ -сигналы в нейронах (рис. 2А – черная кривая) и астроцитах (рис. 2Б – черная кривая) – первая фаза представляет собой обратимое повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , а вторая фаза является глобальным повышением  $[Ca^{2+}]_i$ , которая приводит к гибели 80% и более клеток (рис. 2В – Control). После 24-х часовой инкубации клеток гиппокампа с ММСК-EVs в разведении 1/5 ( $6.4 \times 10^8$  частиц/мл) моделирование OGD также вызывает двухфазные

Ca<sup>2+</sup>-сигналы в нейронах (рис. 2А – красная кривая) и астроцитах (рис. 2Б – красная кривая), причем фаза глобального повышения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> наступает быстрее, по сравнению с контрольными клетками, а гибель клеток после 40 минут OGD составляет также 60 ± 20% (рис. 2В). ММСК-EVs в концентрации 1/10 (3.2×10<sup>8</sup> частиц/мл) также не влияет достоверно на OGD-индуцированную гибель клеток, которая составляет 57 ± 19% клеток (рис. 2В). Однако, после 24-х часовой инкубации клеток с ММСК-EVs в концентрации 1/20 происходит подавление OGD-индуцированного глобального повышения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в нейронах (рис. 2А – оранжевая кривая), а в астроцитах еще и существенно ингибируется первая фаза повышения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (рис. 2Б – оранжевая кривая). При такой концентрации ММСК-EVs гибель клеток после 40 минут OGD снижается до 16 ± 7% клеток (рис. 2В).

Условия OGD (40 минут), сменяющиеся реоксигенацией (24 часа) являются более токсической моделью исследования эффектов ишемии/реоксигенации. Клетки гиппокампа после OGD в среде Neurobasal лишенной глюкозы и кислорода, возвращали в CO<sub>2</sub>-инкубатор в полной среде, после чего выделяли тотальную РНК и проводили ПЦР-анализ (рис. 2Г). Оказалось, что высокая и низкая концентрации ММСК-EVs оказывают совершенно противоположные эффекты на паттерны OGD/R-индуцированной экспрессии мРНК исследованных генов. Так, ММСК-EVs в разведении 1/5 приводят к подавлению экспрессии генов, кодирующих цитопротекторные белки (Bcl-2, Bcl-xL, BDNF, GDNF), а уровень генов, кодирующих белки, вовлеченные в клеточную гибель, наоборот, усиливается (Nf-kB, Tnfa, Cas-3, IL-1β) (рис. 2Г – черные столбцы). А при использовании ММСК-EVs в разведении 1/20, наоборот, происходит усиление OGD/R-индуцированной экспрессии генов Bax, Bcl-2, Bcl-xL, IL-10, Socs3, Stat3, Hif1α, GDNF и Cat, кодирующих цитопротекторные белки, а уровень белков клеточной гибели достоверно не меняется (рис. 2Г – красные столбцы).

Таким образом, цитопротекторные свойства ММСК-EVs строго зависят от их концентрации. Высокие дозы ММСК-EVs не приводят к активации феномена гипоксического прекондиционирования нейронов, подавлению глобального повышения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> при OGD и клеточной гибели. При этом концентрация ММСК-EVs 1/20 вызывает спектр защитных реакций – усиление базовой и OGD/R-индуцированной экспрессии защитных белков, снижение клеточной гибели и активацию гипоксического прекондиционирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ – МД-752.2022.1.4 и темы государственного задания № 121032500125-6.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Turovsky E.A., Golovicheva V.V., Varlamova E.G. et al.* // Int. J. Biol. Sci. 2022. 18(14): 5345-68.
2. *Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Vedunova M.V. et al.* // Neurosci. Bull. 2020. 36(7): 733-60.
3. *Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P. et al.* // Neurosci. Lett. 2011. 496: 11-14.

## ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

*Чернышёв В.С.<sup>1</sup>, Яценюк А.<sup>2</sup>, Кларк И.<sup>3</sup>, Склад М.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва, Россия

<sup>3</sup>Университет штата Юта, Солт-Лейк-Сити, США

**Введение.** Внеклеточные везикулы (ВВ) присутствуют во всех жидкостях организма, включая кровь, мочу, слюну, молоко и амниотическую жидкость. Размеры ВВ часто представляются со значительной вариабельностью между исследованиями. Было обнаружено, что результаты размеров зависят от метода анализа, отражая разницу в физических принципах, используемых различными аналитическими методами [1,2]. Например, анализ траекторий наночастиц (АТН) — наиболее широко используемый метод определения размеров — оценивает размер ВВ в форме гидродинамического диаметра, который характеризует сопротивление броуновскому движению ВВ в растворе. Большой гидродинамический диаметр означает меньшую подвижность в жидкости. Слой белков и других молекул, присутствующих вокруг ВВ, из-за связывания или адсорбции на поверхности мембраны, существенно препятствует подвижности и увеличивает гидродинамический размер ВВ. В относительном выражении это увеличение особенно велико для малых ВВ [3].

Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ) является золотым стандартом для определения размеров и морфологии ВВ в их гидратированных состояниях. Тем не менее, высокая стоимость оборудования и специализированный опыт, необходимый для его правильного использования, мотивируют изучение альтернативных методов, которые могут отображать гидратированные ВВ. Относительно небольшое количество ВВ, наблюдаемых или охарактеризованных на полученных крио-ПЭМ изображениях, является еще одним недостатком этого метода.

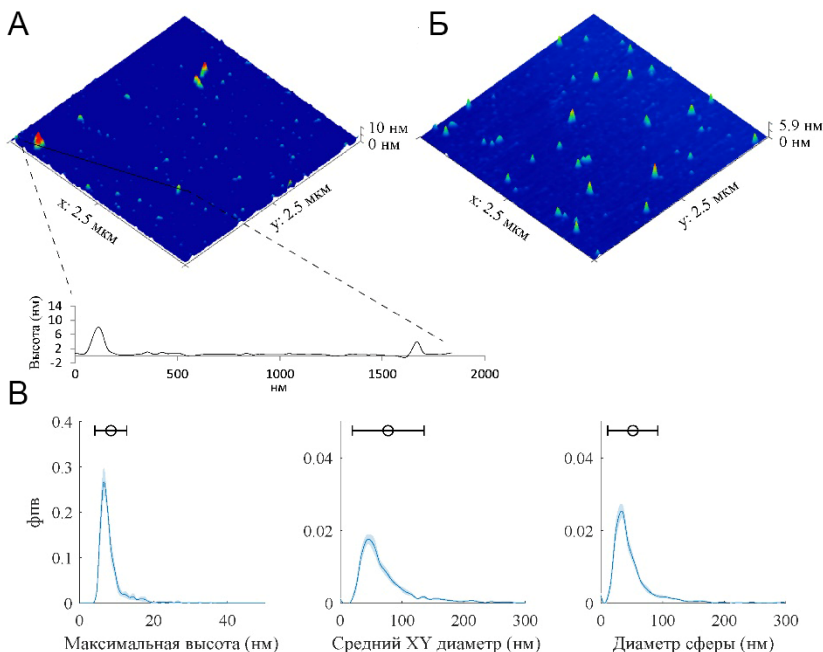


Атомно-силовая микроскопия (АСМ) визуализирует трехмерную топографию гидратированных или высушенных ВВ [4-6] путем сканирования зонда по подложке для получения растрового изображения частиц на поверхности. В данном исследовании показаны основные шаги протокола для анализа ВВ с помощью АСМ. Перед визуализацией ВВ в жидкости их необходимо иммобилизовать на подложке либо используя связывание с функционализированной поверхностью, либо с помощью электростатики [7]. Электростатическая фиксация на положительно заряженном субстрате является особенно удобным вариантом для иммобилизации ВВ, которые имеют отрицательный дзета-потенциал [3,8]. Однако, те же самые электростатические силы, которые иммобилизуют ВВ на поверхности, также искажают их форму, что делает необходимым подробный анализ данных после визуализации. Данный анализ показан, в форме алгоритма, который оценивает размер сферических везикул в растворе на основе данных АСМ об искаженной форме ВВ, иммобилизованных на поверхности

В разработанном протоколе представлена процедура надежной электростатической иммобилизации ВВ, за которой следуют шаги, необходимые для выполнения визуализации в гидратированном или высушенном состояниях. Выявлены факторы, влияющие на поверхностную концентрацию иммобилизованных везикул. Даны рекомендации по проведению электростатической иммобилизации образцов с различной концентрацией ВВ в растворе. Обсуждается выбор экспериментальных условий, позволяющих оценить эмпирические распределения вероятностей различных биофизических свойств на основе достаточно большого числа иммобилизованных ВВ. Приведены примеры анализа данных АСМ, используя бесплатное программное обеспечение Gwyddion с открытым исходным кодом, доступное по лицензии GNU General Public License [9] и показана важность выбора метода нахождения диаметра ВВ в изначальной сферической форме. Репрезентативные результаты показывают согласованность размеров везикул с помощью АСМ с результатами крио-ПЭМ.

**Результаты.** Пример полученных результатов представлен на рис. 1. Иммобилизация ВВ из биологической жидкости, сканирование поверхности и анализ изображений являются важными этапами разработанного протокола для АСМ-характеризации ВВ. Количество везикул, которых можно визуализировать с помощью АСМ, зависит от отображаемой площади поверхности и поверхностной концентрации везикул, иммобилизованных на подложке. Учитывая отрицательный дзета-потенциал ВВ, мы поддерживаем электростатическую фиксацию ВВ из жидких образцов на подложке АСМ. Иммобилизация эффективна, когда поверхность заряжена положительно. Перед иммобилизацией ВВ может потребоваться модификация заряда подложки для получения

положительного заряда, как в случае слюды — слоистого силикатного минерала. Поверхность свежесколотой слюды близка к идеально ровной, что оптимально для визуализации наночастиц с помощью АСМ, но ее поверхностный заряд отрицателен и, следовательно, должен быть модифицирован. Процедура получения положительной поверхности подложки АСМ основана на использовании, например хлорида никеля (II) (10 ммоль  $\text{NiCl}_2$ ). Репрезентативные результаты показывают заметное улучшение фиксации ВВ от биожидкости к субстрату из модифицированной слюды.



**Рис. 1.** Пример АСМ изображений ВВ на поверхности модифицированной слюды. (А) Изображение высоты образца в жидкости. Данные о высоте трех ВВ, пересекаемых линией, показанной на панели, иллюстрируют несферическую форму, вызванную электростатической иммобилизацией ВВ к положительно заряженной поверхности модифицированной слюды. (Б) Изображение высоты образца ВВ в высушенной форме. (В) Пример результатов анализа ВВ (максимальная высота, средний диаметр и диаметр сферы), количество которых представлено в форме функции плотности вероятности (фпв). Диаметр сферы был определен, исходя из данных объема везикул, полученных АСМ. Объем сфер, представленных на графике, эквивалентен объему соответствующих ВВ, которые были иммобилизованы на поверхности подложки и сканировались в деформированной форме.

При визуализации гидратированных везикул важно минимизировать испарение образца, которое вызывает артефакты на поверхности и конвективные потоки и со временем увеличивает концентрацию в жидкости, что приводит к более высокой поверхностной концентрации иммобилизованных везикул, особенно во время длительной инкубаций. Держатели зондов, специально предназначенные для жидких образцов, устраняют или замедляют испарение и должны использоваться для визуализации гидратированных ВВ. Неспецифическое связывание со сканирующим зондом снижается в присутствии ионных соединений, поэтому при визуализации гидратированных ВВ предпочтительнее покрывать субстрат буферной средой, такой как фосфатный буфер, вместо деионизированной воды. Рекомендуется выполнять поверхностную иммобилизацию ВВ на поверхности модифицированной слюды из жидких образцов, даже если целью является характеристика высушенных везикул в воздухе. Когда ВВ не иммобилизованы на поверхности из жидкого образца, их пассивное осаждение путем испарения будет производить артефакты, известные под общим названием эффект кофейного кольца [10].

Два легко контролируемых фактора позволяют пользователю настроить поверхностную концентрацию иммобилизованных ВВ на модифицированном субстрате слюды: концентрацию везикул в образце жидкости и время инкубации образца на субстрате. Высокая плотность иммобилизованных везикул, достигаемая за счет более длительного времени инкубации и более высокой концентрации ВВ в жидкости, увеличивает количество везикул, анализируемых при сканировании, и статистическую достоверность выводов, полученных при анализе данных АСМ. В то же время чрезмерно плотная поверхностная концентрация, когда частицы плотно покрывают всю поверхность без промежуточных областей подложки, усложняет анализ изображения и интерпретацию результатов и может привести к артефактам сканирования, вызванным взаимодействием между близко расположенными частицами.

Иммобилизованные везикулы могут представлять собой образец жидкости со смещением распределения по размерам. В случае, когда скорость иммобилизации лимитируется диффузией, везикулы с меньшими гидродинамическими размерами, определяемыми сочетанием размера везикул и толщины окружающего их слоя, с большей вероятностью оказываются вблизи поверхности, из-за их повышенной подвижности. Следовательно, гидродинамически малые ВВ будут представлены на субстрате в большем количестве, по сравнению с другими. Длительная инкубация при оптимальной концентрации ВВ (от  $4.0 \times 10^9$  до  $4.0 \times 10^{10}$  частиц/мл) позволяет избежать этого эффекта.

ВВ в их естественном гидратированном состоянии и после высухания могут быть охарактеризованы с помощью АСМ. Электростатические силы, которые иммобилизуют ВВ на поверхности

слюды, также искажают их форму по сравнению с глобулярной геометрией, в которой они существуют в растворе. Влияние высыхания на размер и морфологию иммобилизованных ВВ можно проанализировать путем повторного сканирования одной и той же площади поверхности до и после того, как образец высохнет.

Иммобилизованные ВВ сохраняют сильно сжатую геометрию после сушки. Высота над поверхностью высушенных везикул становится меньше, а площадь их следа увеличивается. С другой стороны, когда везикулы осаждаются пассивно во время испарения жидкости и без предварительной иммобилизации на поверхности, они имеют тенденцию приобретать чашеобразную геометрию при высыхании, что уже давно наблюдается на изображениях сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и, в последнее время, в АСМ. Эта чашеобразная форма теперь признана артефактом подготовки образца, вызванным неравномерностью капиллярных сил во время высыхания поверхности [1].

Реакции на электростатические и капиллярные силы, искажающие форму ВВ, дают ценную информацию об их структурных и композиционных свойствах. Например, набор биофизических характеристик, таких как деформированный размер и форма, извлеченные из данных АСМ, недавно были использованы для демонстрации возможности дифференцировать ВВ, секретируемые разными клетками [5]. Искажения также могут быть учтены и компенсированы. Например, можно использовать данные АСМ для характеристики шаровидного размера везикул в растворе путем оценки диаметров сфер, которые инкапсулируют тот же объем, что и иммобилизованные ВВ. Помимо этого программные обеспечения такие как Gwyddion позволяют проводить реконструкцию изображения для выявления кластеров, порой состоящих из множества агрегированных ВВ, и в последствие способных получить более точные данные и полезную информацию о везикулах.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-13-00035 и № 23-74-00022).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Chernyshev V.S. et al.* // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2015. 407: 3285-301.
2. *Ramirez M.I. et al.* // Nanoscale. 2018. 10: 881-906.
3. *Skliar M. et al.* // 2018. 501: 1055-9.
4. *Parisse P. et al.* // European Biophysics Journal. 2017. 46: 813-20.
5. *Ito K. et al.* // Journal of Physical Chemistry B. 2018. 122: 6224-35.
6. *Sharma S., LeClaire M., Gimzewski J.K.* // Nanotechnology. 2018. 29: 132001.
7. *Meyer R.L.* // Ultramicroscopy. 2010. 110: 1349-57.
8. *Chernyshev V.S. et al.* // Journal of Extracellular Vesicles. 2022. 11: e12256.
9. *Nečas D., Klapetek P.* // Open Physics. 2012. 10: 181-8.
10. *Chernyshev V.S., Skliar M.* // Biosensors (Basel). 2022. 12(6): 371.

## ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЭКЗОСОМ ПРИ СТАРЕНИИ МУЛЬТИПОТЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ИХ АДИПОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

*Чечехина Е.С.<sup>1</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1</sup>, Григорьева О.А.<sup>2</sup>,  
Новоселецкая Е.С.<sup>2</sup>, Басалова Н.А.<sup>2</sup>, Александрушкина Н.А.<sup>2</sup>,  
Арбатский М.С.<sup>2</sup>, Виговский М.А.<sup>2</sup>, Зиновьева А.А.<sup>1</sup>,  
Бахчинян Е.<sup>1</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Старение и ожирение являются основными факторами риска в развитии диабета, сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний, поэтому важность исследований, посвященных изучению возраст-ассоциированных нарушений жировой ткани достаточно велика. Жировая ткань – энергетическое депо и важный эндокринный орган [1,2]. Воспаление и дисфункция жировой ткани связаны с возраст- и ожирение-ассоциированной инсулинорезистентностью, метаболическим синдромом и диабетом, артериальной гипертензией и атеросклерозом [3-5]. Для нормального функционирования в течение жизни жировая ткань должна постоянно обновляться, и нормальная скорость этого процесса составляет примерно 10% клеток в год [6,7]. Замедление обновления жировой ткани приводит к накоплению гипертрофированных адипоцитов, которые сохраняют способность к накоплению липидов, но ослабляют свою эндокринную функцию [8].

В течение жизни обновление жировой ткани обеспечивается дифференцировкой мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК). Инсулин является ключевым физиологическим индуктором дифференцировки МСК в адипоциты [9]. Нарушение чувствительности МСК к инсулину может негативно влиять на обновление жировой ткани и способствовать развитию гипертрофии адипоцитов, а также нарушению обмена веществ [10]. Существует множество доказательств того, что старение и ожирение связаны с увеличением количества стареющих клеток во многих органах, в том числе в популяции МСК [11-14].

Старение – это клеточный ответ на эндогенные и экзогенные стрессы, суть которого заключается в ограничении пролиферации поврежденных и дисфункциональных клеток. Накопление подобных клеток в популяции заметно способствует как физиологическому старению, так и возрастным заболеваниям [12,15,16]. Старение клеток

может быть вызвано различными стимулами, такими как повреждение ДНК, укорочение теломер, митохондриальная дисфункция и др. [17]. Одной из первых установленных моделей клеточного старения было репликативное старение, описанное в длительно культивируемых клетках и связанное с укорочением теломер – структур ДНК, расположенных на концах эукариотических хромосом и защищающих их от деградации, а также активацией ингибиторов клеточного цикла (p16, p21 и p53). Стареющие клетки также обычно характеризуются увеличенным размером клеток, уплощенной морфологией и повышенной активностью (SA)- $\beta$ -галактозидазы, ассоциированной со старением. Однако наиболее важным признаком старения МСК являются функциональные изменения, вызванные метаболическими, генетическими, эпигенетическими, транскрипционными и трансляционными изменениями [14]. Кроме того, эти клетки приобретают ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP), включающий секрецию факторов, способных влиять на поведение соседних клеток через паракринные механизмы и перепрограммировать микроокружение в сторону просенесценции [18,19]. Действие компонентов SASP может опосредовать дисфункцию жировой ткани и резистентность к инсулину в периферических тканях, способствуя метаболическим нарушениям, включая возникновение сахарного диабета II типа [13,20]. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что при старении организма в МСК наблюдается нарушение нормальных функций стволовых клеток (пролиферация и дифференцировка), что способствует прогрессирующему снижению обновления и регенерации тканей [14,21-23]. Например, было показано, что адипогенная дифференцировка нарушена в репликативных стареющих МСК человека из подкожной жировой ткани [24,25].

Таким образом, из-за нарушения передачи инсулинового сигнала и изменения дифференцировочного потенциала стареющих МСК регуляция и обновление клеток жировой ткани могут нарушаться, способствуя развитию метаболического синдрома, ожирения и других заболеваний. В данном исследовании мы изучали механизмы влияния старения на адипогенный потенциал МСК жировой ткани человека и возникновение их инсулинорезистентности.

**Материалы и методы. Клеточные культуры.** Первичные клеточные линии МСК, использовавшиеся в исследовании, выделены из абдоминальной жировой ткани здоровых молодых (n = 6, медиана возраста 38 лет) и пожилых (n = 10, возраст >65 лет, медиана возраста 69 лет) доноров. Клетки культивировали в базальной среде для МСК, содержащей среду AdvanceSTEM с 10% добавкой для роста МСК, 1% раствора пенициллина/стрептомицина, 1% L-глутамин в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки пассировали с использованием раствора Версена и раствора НуQTase с соотношением субкультивирования 1:3. Для

экспериментов использовали МСК, культивируемые до 4-5-го пассажей в случае контроля и МСК от пожилых доноров и до 9-12-го пассажей – в случае индуцированного репликативного старения.

**Выделение внеклеточных везикул.** МСК культивировали до 90-100% от монослоя, затем промывали буферным раствором Хэнкса и инкубировали в течение 48 ч в DMEM с низким содержанием глюкозы без фенолового красного. Внеклеточные везикулы (ВВ) выделяли из кондиционированной среды с использованием фильтра Amicon (300 кДа). Размер частиц и концентрацию образцов ВВ анализировали с помощью анализа траектории наночастиц, морфологию визуализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, а экзосомальные маркеры в ВВ или лизатах МСК оценивали с помощью иммуноблоттинга, как описано в статье Basalova et al. [26].

**Характеристика клеточного старения.** С помощью системы анализа живых клеток оценивали пролиферацию МСК. Также была оценена длина теломер, измерено количество p21-положительных клеток и активность  $\beta$ -галактозидазы, ассоциированной со старением (иммуноцитохимически). Компоненты SASP – IL-6, MCP-1 и PAI-1 измеряли в кондиционированных средах МСК с помощью ELISA.

**Адипогенная дифференцировка.** Клетки направляли на адипогенную дифференцировку с использованием коктейля для адипогенной дифференцировки, содержащего DMEM с низким содержанием глюкозы с добавлением 10% FBS, 1% раствора пенициллина/стрептомицина, 1 мкМ дексаметазона, 200 мкМ инсулина и 0.5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина в течение 14 дней. Среду обновляли каждые 2-3 дня. Чтобы оценить влияние ВВ на адипогенную дифференцировку, предварительно обрабатывали клетки ВВ, растворенными в DMEM с низким содержанием глюкозы за сутки до индукции адипогенной дифференцировки. На следующий день индуцировали адипогенную дифференцировку, добавляя к клеткам компоненты дифференцировочного коктейля, дополненного ВВ, а затем обновляя среду аналогичным образом каждые 2-3 дня. Накопление внутриклеточных липидных капель с течением времени дифференцировки визуализировали с помощью микроскопии в проходящем свете. По окончании дифференцировки нейтральные липиды дополнительно окрашивали красителем Nile Red и визуализировали в тех же полях зрения. Уровни мРНК мастер-генов адипогенной дифференцировки оценивали через 14 дней после индукции дифференцировки.

**Вестерн-блоттинг.** Образцы белка получали путем лизиса клеток в буфере, затем разделяли методом SDS-PAGE. После этого белки переносили на мембрану PVDF с помощью вестерн-блоттинга и производили окрашивание белок-специфичными антителами к тотальному Akt, фосфорилированному T308 Akt, тотальному ERK,

фосфорилированному ERK и винкулину. Показания общего объема окрашивания Akt и ERK нормализовали к соответствующему уровню винкулина, а затем показания объема для p-Akt или p-ERK сравнивали с соответствующими нормализованными значениями Akt или ERK.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Относительную экспрессию генов-маркеров адипогенной дифференцировки PPAR $\gamma$  и адипонектина анализировали с помощью полуколичественной ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использовали ген 60S рибосомного белка P0 (RPLP0). Количественную оценку и нормализацию уровней экспрессии генов-мишеней и гена RPLP0 рассчитывали с использованием  $\Delta\Delta$ CT метода.

**ПЦР-анализ микроРНК в составе ВВ и биоинформатический анализ.** МикроРНК из ВВ определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессии микроРНК рассчитывали относительно уровней референсных микроРНК SNORD61, SNORD95, SNORD96a, RNU6 с использованием сравнительного метода  $\Delta$ CT.

Анализ массива микроРНК проводили с использованием веб-сервера sRNAtoolbox. С использованием баз данных TargetScan7.2, HMDD, miR2Disease, miRwayDB были проанализированы микроРНК, связанные с процессом старения. Предсказание функций микроРНК было выполнено с использованием Gene Ontology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and базы данных Genomes (KEGG). Кластеризация генов GO и KEGG выполнялась с использованием базы данных David 6.8. Контроль качества, картирование и нормализация массива микроРНК выполнялись с использованием веб-платформы для глубокого секвенирования данных BrowserGenome 1.0. Предсказанные мишени микроРНК были проанализированы с использованием баз данных miRNet, miRBase и miRDB. Получив списки мишеней для идентифицированных микроРНК, с помощью платформы CytoScape мы создали на их основе карты взаимодействия, где микроРНК обозначали в виде узлов, а мишени микроРНК – в виде ребер.

**Результаты.** Среднее значение времени удвоения популяции клеток, полученных от пожилых доноров, было выше по сравнению с МСК молодых доноров (81.2 ч против 60.5 ч), а продолжительность лаг-фазы была несколько короче (24.8 ч против 27.7 ч). Таким образом, более короткая лаг-фаза (более раннее появление митотических клеток в культуре) может свидетельствовать о наличии небольшой пролиферирующей субпопуляции, способствовавшей росту клеточной популяции. Однако общий потенциал пролиферации МСК от пожилых доноров был ниже, что подтверждалось более короткими теломерами в этих клетках и небольшим увеличением экспрессии p21. Экспрессия бета-галактозидазы также была выше в МСК от пожилых доноров по сравнению с контрольными клетками. Также эти клетки были



охарактеризованы наличием SASP, что выражалось в увеличении секреции IL-6 (38.6 против 11.7 нг/мл), MCP-1 (304.9 против 6.1 нг/мл) и PAI-1 (4.2 против 1.1 нг/мл) по сравнению с МСК от молодых доноров.

Чтобы выяснить, как старение влияет на адипогенный потенциал МСК, мы стимулировали дифференцировку контрольных и стареющих МСК в адипоциты. Стандартный коктейль адипогенной дифференцировки включает индукторы гормональной дифференцировки (инсулин и дексаметазон), а также индометацин, прямой активатор транскрипционного фактора PPAR $\gamma$ , который является транскрипционным мастером-регулятором адипогенной дифференцировки. Целью нашего исследования было показать участие инсулин-зависимого сигнального каскада в изменении адипогенного потенциала МСК при старении, поэтому в данной работе индометацин не использовали. Как нам удалось показать, старение снижает как эффективность, так и скорость дифференцировки МСК в адипогенном направлении. Индукция репликативного старения приводит к аналогичному результату. Кроме того, мы измеряли экспрессию маркерных генов адипогенной дифференцировки. Экспрессия PPAR $\gamma$ , а также ключевого адипокина адипонектина была снижена в стареющих клетках после 14 дней адипогенной дифференцировки. Таким образом, старение снижает адипогенный потенциал МСК жировой ткани.

Для выявления молекулярных механизмов снижения адипогенного потенциала стареющих МСК мы исследовали их чувствительность к инсулину. С помощью вестерн-блоттинга мы измерили временную динамику инсулин-зависимого фосфорилирования Akt (что указывает на активацию сигнального каскада PI3-киназы) и митоген-активируемых протеинкиназ Erk1/2. Мы обнаружили, что инсулин-зависимое повышение фосфорилирования этих киназ резко снижено в стареющих клетках. Репликативные клетки показали аналогичный эффект. Снижение относительного изменения уровня фосфорилирования может быть связано либо со снижением инсулин-зависимой активации, либо с высоким базальным уровнем фосфорилирования. Абсолютный уровень фосфорилирования Akt и Erk1/2 после действия инсулина на сенесцентные клетки не изменился. С другой стороны, стареющие МСК продемонстрировали значительно повышенный базальный уровень фосфорилирования как Akt, так и Erk1/2 в нестимулированных клетках. В результате относительные изменения уровня фосфорилирования в стареющих клетках были значительно ниже. Таким образом, стареющие МСК демонстрируют устойчивость к развитию эффектов инсулина за счет высокого базального уровня фосфорилирования Akt и Erk1/2 [27].

Выясняя возможные механизмы наблюдаемого снижения адипогенного потенциала и инсулиновой резистентности стареющих

МСК, мы сравнили состав микроРНК во внеклеточных везикулах, секретируемых МСК молодых и пожилых доноров. Мы идентифицировали ряд микроРНК, уровень экспрессии которых значительно различался. Биоинформатический анализ показал общие мишени для микроРНК, уровень экспрессии которых наиболее заметно повышался во ВВ, секретируемых стареющими МСК. Эти мишени связаны с такими процессами, как поддержание теломер, репарация ДНК и реакция на повреждение ДНК. При этом мишени, которые негативно регулировались обнаруженными микроРНК, участвовали в регуляции PI3-киназы и сигнального пути трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ). Мы также обнаружили ряд miRNAs, уникальных для ВВ, секретируемых стареющими МСК. Среди наиболее вероятных предсказанных мишеней для всех достоверно отличающихся микроРНК были белки, регулирующие передачу сигналов инсулина и адипогенную дифференцировку – PTEN, MAPK1, MDM2, GAREM1, IGF1R, PLCB1 и Ago1. Все эти мишени участвуют в развитии и регуляции проадипогенных сигналов в клетках. Таким образом, внеклеточные везикулы, экспрессируемые стареющими клетками, потенциально могут быть негативными регуляторами адипогенной дифференцировки МСК [27].

Далее мы исследовали влияние внеклеточных везикул и содержащихся в них микроРНК на адипогенный потенциал МСК. Для этого мы обрабатывали контрольные МСК ВВ от стареющих клеток и, наоборот, МСК, выделенные от пожилых доноров, обрабатывали ВВ, выделенными из контрольных клеток. После обработки клеток везикулами в течение суток мы стимулировали клетки к дифференцировке в адипоциты. При каждой смене среды дифференцировки добавляли новую порцию соответствующих ВВ. Было показано, что ВВ, секретируемые стареющими МСК, значительно снижают как долю дифференцирующихся клеток в популяции, так и скорость адипогенной дифференцировки. ВВ, секретируемые репликативными МСК, показали аналогичный эффект. В то же время ВВ, секретируемые МСК молодых доноров, повышали адипогенный потенциал МСК, выделенных от пожилых доноров. ВВ, секретируемые МСК от пожилых доноров или молодых доноров, существенно не изменяют адипогенный потенциал стареющих или контрольных МСК соответственно. Таким образом, ВВ оказывают физиологическое влияние на адипогенный потенциал МСК, причем действие ВВ различается в зависимости от их источника.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Galic S., Oakhill J.S., Steinberg G.R. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010. 316(2):129-39.
2. Kershaw E.E., Flier J.S. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. 89(6): 2548-56.
3. Guilherme A., Virbasius J.V., Puri V., Czech M.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. 9(5): 367-77.
4. Hajer G.R., van Haeften T.W., Visseren F.L.J. // *Eur. Heart J.* 2008. 29(24): 2959-71.
5. Palmer A.K., Xu M., Zhu Y. et al. // *Aging Cell.* 2019. 18(3): e12950.
6. Arner E., Westermark P.O., Spalding K.L. et al. // *Diabetes.* 2010. 59(1): 105-9.
7. Spalding K.L., Arner E., Westermark P.O. et al. // *Nature.* 2008. 453(7196): 783-7.
8. Hammarstedt A., Gogg S., Hedjazifar S. et al. // *Physiol. Rev.* 2018. 98(4): 1911-41.
9. Zhang Y., Khan D., Dellings J., Tobiasch E. // *ScientificWorldJournal.* 2012. 2012: 793823.
10. Kim S.M., Lun M., Wang M. et al. // *Cell Metab.* 2014. 20(6): 1049-58.
11. Cárdenes N., Álvarez D., Sellarés J. et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. 9(1): 1-10.
12. Childs B.G., Durik M., Baker D.J. et al. // *Nat. Med.* 2015. 21(12): 1424-35.
13. Narasimhan A., Flores R.R., Robbins P.D., Niedernhofer L.J. // *Endocrinology.* 2021. 162(10): bqab136.
14. Neri S., Borzi R.M. // *Biomolecules.* 2020. 10(2): 340.
15. van Deursen J.M. // *Nature.* 2014. 509(7501): 439-46.
16. McHugh D., Gil J. // *J. Cell Biol.* 2018. 217(1): 65-77.
17. Liu J., Ding Y., Liu Z., Liang X. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. 8: 258.
18. Borodkina A.V., Deryabin P.I., Giukova A.A., Nikolsky N.N. // *Acta Naturae* (англоязычная версия), 2018. 10(1): 4-14.
19. Campisi J., Kapahi P., Lithgow G.J. et al. // *Nature.* 2019. 571(7764):183-92.
20. Schafer M.J., Miller J.D., LeBrasseur N.K. // *HHS Public Access.* 2018. 455: 93-102.
21. Efimenko A., Dzhoyashvili N., Kalinina N. et al. // *Stem Cells Transl. Med.* 2014. 3(1): 32-41.
22. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Efimenko A.Y., Tkachuk V.A. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. 8: 576176.
23. Schimke M.M., Marozin S., Lepperdinger G. // *Front. Physiol.* 2015. 6: 362.
24. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Efimenko A. et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. 9: 662078.
25. Mitterberger M.C., Lechner S., Mattesich M., Zwerschke W. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. 69(1): 13-24.
26. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M. // *Cells.* 2020. 9(5): 1272.
27. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O. et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. 10: 1050489.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА С КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ  
ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ  
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

*Якимова А.С.<sup>1</sup>, Непша О.С.<sup>2</sup>, Гаврилов М.Ю.<sup>2</sup>, Романов Е.А.<sup>2</sup>,  
Шевцова Ю.А.<sup>2</sup>, Силачев Д.Н.<sup>2</sup>, Макарова Н.П.<sup>2</sup>, Калинина Е.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии  
им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

**Введение.** Чтобы произошло оплодотворение, сперматозоидам необходимо пройти сложный путь через женский репродуктивный тракт и достичь яйцеклетки. На протяжении всего пути мужские половые клетки встречаются с различными механизмами отбора. Строгий процесс отбора гарантирует, что из миллиона сперматозоидов, содержащихся в эякуляте, к месту оплодотворения придут только тщательно отобранные сперматозоиды [1]. Один из этапов отбора происходит в матке. Там на сперматозоиды оказывает влияние эндометрий, внутренний слой стенки матки. Причем эндометрий может воздействовать на сперматозоиды как при прямом контакте клеток, так и через вырабатываемые им внеклеточные везикулы.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой пузырьки наноразмеров, которые были выделены из широкого спектра биожидкостей. Везикулы вырабатываются различными типами клеток организма, и их мембраны состоят из липидного бислоя, аналогичного плазматической мембране клетки-продуцента. ВВ являются средством межклеточной коммуникации и оказывают влияние на многие биологические процессы в клетках. В своем составе везикулы транспортируют белки, липиды, ДНК и различные виды РНК [2]. Связывание везикул с клеткой-мишенью может происходить разными путями. В настоящее время известны следующие механизмы доставки биоактивных молекул, содержащиеся во ВВ, в клетку-мишень: взаимодействие рецептор-лиганд (запуск соответствующего регуляторного каскада в клетке-реципиенте осуществляется без проникновения везикулы в клетку), интернализации посредством фагоцитоза, макропиноцитоза, клатрин-опосредованного и кавеолин-зависимого эндоцитоза и интернализация, опосредованная липидным рафтом [3,4].

Внеклеточные везикулы важны для созревания сперматозоидов во время их прохождения через женский репродуктивный тракт. ВВ могут связываться со сперматозоидами и влиять на их морфофункциональные

характеристики. Например, изменять характер движения сперматозоида, индуцировать гиперактивацию, капацитацию, акросомную реакцию, способствовать выживанию в женских половых путях и влиять на жизнеспособность в целом [2].

Внеклеточные везикулы могут быть использованы в программах ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологии) для подготовки сперматозоидов и, как следствие, повышения частоты наступления беременности. Применение везикул может приблизить условия отбора сперматозоидов *in vitro* к естественной селекции в женских половых путях: вероятно, те сперматозоиды, которые связываются с везикулами, являются более активными и жизнеспособными и легче проникают дальше по женскому репродуктивному тракту.

**Цель** данного исследования – исследовать регуляторную роль внеклеточных везикул клеток эндометрия в изменении подвижности и морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека в условиях *in vitro*.

**Материалы и методы.** Для получения внеклеточных везикул производили культивирование клеток эндометрия. Материал для культивирования получали путем биопсии эндометрия. Фракцию сперматозоидов выделяли из семенной жидкости пациентов методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности. Осадок ресуспензировали для достижения необходимой концентрации.

Для оценки влияния везикул на сперматозоиды проводилась их совместная инкубация в течение 60, 120 и 180 минут. Везикулы для инкубации выделяли из кондиционной среды культуры клеток эндометрия путем последовательного центрифугирования при разных скоростях вращения. Сбор кондиционной среды производился до 7 пассажа при достижении культурой клеток 70% конfluenceности. Для чистоты эксперимента среда, в которой культивировали эндометрий, предварительно была отчищена от везикул. Количество везикул для инкубации со сперматозоидами рассчитывали по концентрации в них белка. В качестве параллельного контроля использовали фракцию сперматозоидов без добавления везикул. Каждый час инкубации оценивались концентрация сперматозоидов и параметры движения при помощи компьютерной аналитической системы CASA. После последнего часа также оценивалась жизнеспособность сперматозоидов

Оценка связывания везикул со сперматозоидами производилась с помощью трансмиссионной-электронной микроскопии (ТЭМ) и флуоресцентной микроскопии. Для ТЭМ сперматозоиды после 180 минут инкубации с везикулами осаждали центрифугированием при 700 g 5 мин и фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1 М буфере. Для флуоресцентной микроскопии был проведен эксперимент по со-культивированию сперматозоидов с культурой клеток эндометрия. Перед

добавлением сперматозоидов эндометрий был окрашен мембранным красителем pkh26. После 48 часов совместной инкубации сперматозоиды осаждали из культуральной среды центрифугированием, фиксировали и окрашивали флуоресцентным красителем DAPI.

**Результаты.** Метод ТЭМ и флуоресцентная микроскопии показали, что везикулы, вырабатываемые клетками эндометрия, связываются со сперматозоидами. Однако процент сперматозоидов, с которыми связались везикулы, низкий и составляет примерно 6-7%.

Оценка параметров движения сперматозоидов на CASA после инкубации с ВВ показала увеличение количества гиперактивных сперматозоидов. Количество гиперактивных сперматозоидов в контрольной группе при этом уменьшается.

**Заключение.** Мы показали, что ВВ клеток эндометрия связываются со сперматозоидами и оказывают влияние на параметры их движения и, что вероятно, может сказываться на оплодотворяющей способности. Однако связываться с везикулами, по-видимому, способны не все сперматозоиды. Это может быть объяснено тем, что *in vivo* из всей фракции мужских гамет, содержащихся в эякуляте, только небольшая часть достигает яйцеклетки и имеет возможность оплодотворить ее.

Внеклеточные везикулы клеток эндометрия могут использоваться в программах ВРТ и повышать эффективность программ с мужским фактором бесплодия. Однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на стандартизацию протоколов выделения и оценки везикул, подбор оптимальных концентраций везикул и времени инкубирования. Также для прогнозирования возможных клинических эффектов необходим анализ транскриптомного, протеомного и метаболомного состава внеклеточных везикул.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Murdica V. et al. // Sci. Rep. 2020. 10(1): 8856.*
2. *Qamar A.Y. et al. // Front. Vet. Sci. 2020. 7: 589117.*
3. *Zhang Y. et al. // Cell Biosci. 2019. 9: 19.*
4. *Jeske R. et al. // Tissue Eng. Part B Rev. 2020. 26(2): 129-44.*

\*\*\*

## СИГНАЛИЗАЦИЯ УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ. БИОЭНЕРГЕТИКА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ VDAC1  
ИНГИБИРУЕТ РАЗВИТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ  
ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

*Белослудцев К.Н.<sup>1</sup>, Старинец В.С.<sup>2</sup>, Серов Д.А.<sup>3,4</sup>,  
Ильзоркина А.И.<sup>2</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия

<sup>3</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

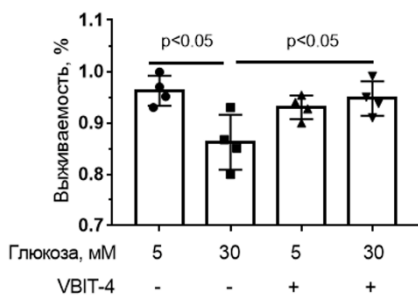
<sup>4</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пушино, Россия

**Введение.** Сахарный диабет (СД) – хроническое метаболическое заболевание, связанное с нарушением секреции инсулина (СД1) и/или инсулинорезистентностью органов и тканей организма человека и животных (СД2), что приводит к развитию гипергликемии. Это приводит к серьезным повреждениям органов и тканей организма человека и животных, что в значительной степени осложняет их жизнедеятельность [1].

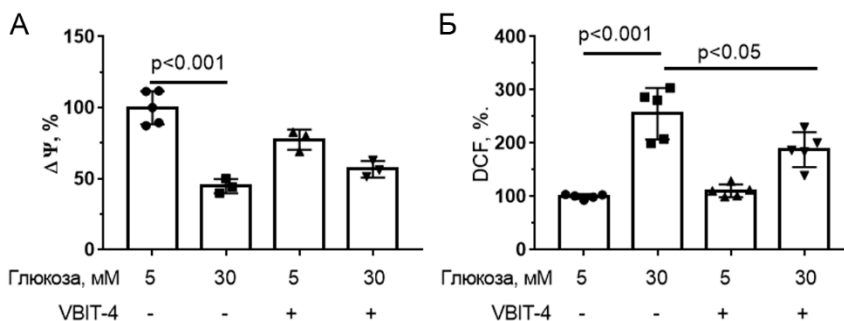
Общепризнанно, что на клеточном уровне сахарный диабет связан с митохондриальной дисфункцией. Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом метаболизме и редокс статусе клетки, поддержании  $Ca^{2+}$  гомеостаза и др. Поэтому при развитии сахарного диабета происходит нарушение многих митохондриальных процессов, начиная от выработки энергии и продукции ROS и заканчивая внутриклеточной регуляцией контроля качества митохондрий [2].

Взаимодействие митохондрий с цитоплазмой, в результате которого происходит обмен метаболитами, нуклеотидами (включая АТФ и АДФ) и ионами, опосредуется пориновыми каналами внешней митохондриальной мембраны – VDACs (voltage-dependent anion channels). VDACs – семейство каналов, включающих 3 изоформы – VDAC1, VDAC2 и VDAC3. Считается, что VDAC1 является ключевым игроком в апоптозе, опосредованном митохондриальным путем [3]. Показано, что развитие сахарного диабета сопровождается гиперэкспрессией VDAC1 в ряде тканей [4]. В связи с этим целью настоящей работы являлось определение гипергликемия-опосредованных механизмов митохондриальной дисфункции в первичных культурах клеток и регуляции этой дисфункции посредством фармакологической и генетической инактивации VDAC1.

**Результаты. 1. VBIT-4 препятствует развитию клеточной гибели и дисфункции митохондрий первичной культуры эндотелиоцитов легких при гипергликемическом стрессе.** Чтобы индуцировать гипергликемический стресс первичную культуру эндотелиоцитов лёгких мышей экспонировали в высокой концентрации глюкозы (30 мМ) в течение 36 часов (контрольные клетки инкубировались в среде, содержащей 5 мМ глюкозы). Как показано на рис. 1, гипергликемия приводила к достоверному снижению жизнеспособности клеток. Инкубация клеток с VBIT-4 (5 мкМ) (ингибитор VDAC) препятствовала снижению жизнеспособности эндотелиоцитов в условиях гипергликемии.



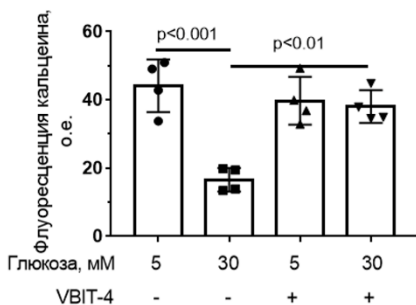
**Рис. 1.** Влияние 5 мкМ VBIT-4 на выживаемость эндотелиоцитов легких мышей в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (n = 4).



**Рис. 2.** Влияние 5 мкМ VBIT-4 на  $\Delta\Psi$ (%) митохондрий (А) и уровень флуоресценции DCF в эндотелиоцитах легких мышей в условиях нормо (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (n = 5)



В условиях гипергликемии наблюдается развитие дисфункции митохондрий, которая опосредуется развитием митохондриальной деполяризацией (рис. 2А), продукцией  $H_2O_2$  (рис. 2Б) и увеличением спонтанного открывания МРТ поры (оценка спонтанного образования МРТ поры в митохондриях клеток осуществлялась по флуоресценции кальцеина в присутствии ионов кобальта) (рис. 3). Препарат ВБИТ-4 приводил к достоверному ингибированию продукции  $H_2O_2$ , открыванию МРТ пор, но не падению мембранного митохондриального потенциала. Более того, 5 мкМ ВБИТ-4 сам по себе снижал мембранный потенциал органелл в условиях нормогликемии.



**Рис. 3.** Интенсивность флуоресценции кальцеина в митохондриях эндотелиоцитов легких мышей в четырех экспериментальных группах. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (n = 4).

**2. Подавление экспрессии *VDAC1* в фибробластах кожи человека нормализует митохондриальную функцию при гипергликемии.** Как следует из полученных результатов фармакологическое подавление *VDAC* каналов с помощью ВБИТ-4 приводит к ослаблению развития митохондриальной дисфункции при гипергликемии. В следующей части работы мы исследовали как снижение экспрессии *VDAC1* в первичной культуре фибробластов кожи человека влияет на гипергликемия-индуцированную дисфункцию митохондрий.

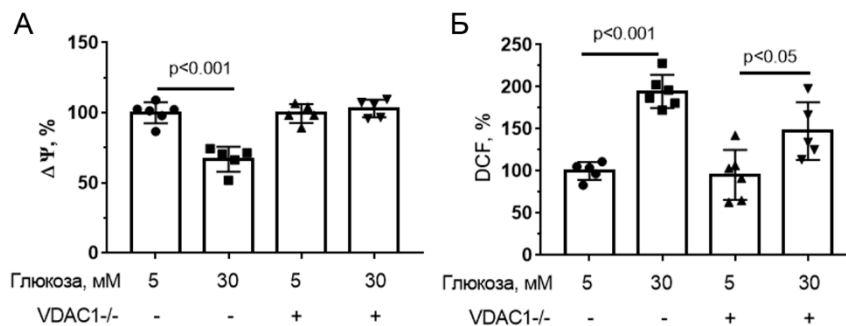
В табл. 1 представлены данные по жизнеспособности контрольных фибробластов и фибробластов с пониженной экспрессией *VDAC1* в условиях нормо- (5 мМ глюкозы) и гипергликемии (30 мМ глюкозы). Можно видеть, что в условиях гипергликемии происходит снижение жизнеспособности контрольных фибробластов кожи человека, что является результатом увеличения количества клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза. В то же время, клетки, со сниженной по *VDAC1* экспрессией были практически не чувствительны к увеличению уровня глюкозы в среде – процент живых клеток в обеих концентрациях глюкозы был примерно равен.

**Табл. 1.** Влияние гипергликемии на выживаемость нормальных (WT) фибробластов и фибробластов с пониженной экспрессией VDAC1 (VDAC1<sup>-/-</sup>).

	Life, %	Early apoptic, %	Apoptic, %	Dead, %
WT (5)*	94.2 ± 1.1	3.6 ± 1.0	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1
WT (30)	89.2 ± 1.2*	7.4 ± 1.4*	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2*
VDAC1 <sup>-/-</sup> (5)	97.2 ± 0.5	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2
VDAC1 <sup>-/-</sup> (30)	96.7 ± 0.7	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.3

\* – указана концентрация глюкозы 5 или 30 мМ.

Подобно данным, полученным на первичной культуре легочных эндотелиоцитов мышей, экспозиция фибробластов кожи человека в условиях гипергликемии вызывает деполяризацию внутренней мембраны митохондрий (рис. 4А) и гиперпродукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (примерно в 2 раза в сравнении с нормогликемией) (рис. 4Б). При гипергликемическом стрессе в клетках с пониженной экспрессией VDAC1 не наблюдалась деполяризация митохондрий, а продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> увеличивалась в 1.6 раза по сравнению с условиями нормогликемии.



**Рис. 4.** Снижение экспрессии VDAC1 препятствует развитию митохондриальной деполяризации и продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в первичной культуре фибробластов кожи человека, индуцированные гипергликемией (30 мМ глюкоза) Представлены средние значения ± стандартное отклонение (n = 5).

Исходя из полученных в настоящей работе данных гипергликемия (30 мМ глюкоза в течение 36 часов) приводит к клеточной гибели как эндотелиоцитов легких мышей, так и фибробластов кожи человека. В основе этой гибели может лежать митохондриальная дисфункция, основными проявлениями которой являются гиперпродукция АФК, увеличение спонтанной активности МРТ поры. Вместе с тем, снижение функциональной активности (олигомеризации) или уровня экспрессии VDAC1 способствует нормализации митохондриальной функции и предотвращает гибель клеток при гипергликемии. Это позволяет говорить о том, что снижение активности VDAC1 может являться важной

стратегией для терапии сахарного диабета.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00120 П).

## ЛИТЕРАТУРА

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diab. Care*. 2022. 45(S1): S17-38.
2. *Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Dubinin M.V.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. 21: 6559.
3. *Messina A., Reina S., Guarino F., De Pinto V.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. 1818(6): 1466-76.
4. *Zhang E., Mohammed Al-Amily I., Mohammed S. et al.* // *Cell Metab.* 2019. 29(1): 64-77.

## ВОЗРАСТНАЯ ДИСФУНКЦИЯ КРЕАТИНКИНАЗНОГО ЦЕЛНОКА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЧЕЛОВЕКА АССОЦИИРОВАНА С НАРУШЕНИЕМ МЯГКОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ МИТОХОНДРИЙ И КОНТРОЛИРУЕМОЙ ПРОДУКЦИЕЙ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

*Высоких М.Ю.<sup>1,2,3</sup>, Виговский М.А.<sup>4,5</sup>, Марей М.В.<sup>2</sup>, Григорьева О.А.<sup>4,5</sup>, Вепхвадзе Т.Ф.<sup>3,5</sup>, Курочкина Н.С.<sup>3</sup>, Манухова Л.А.<sup>2</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>4,5</sup>, Попов Д.В.<sup>3,5</sup>, Скулачев В.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Научно-Исследовательский Институт Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный Медицинский Исследовательский Центр Акушерства, Гинекологии и Перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт Медико-биологических Проблем РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт Регенеративной Медицины Медицинского Научно-Образовательного Центра Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>5</sup>Факультет Фундаментальной Медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** В последнее время появляется все больше данных в пользу теории, что основной причиной процесса старения и дегенеративных заболеваний является генетически запрограммированный сдвиг баланса продукции и утилизации свободных радикалов в живых

системах (ранее называемый окислительный стресс) [1,2]. Этапы раннего старения, характеризующиеся снижением физической активности, как правило, связаны с дисфункцией скелетных мышц из-за повышения уровня окислительного стресса митохондриального происхождения. Активные формы кислорода (АФК) представляют собой высокореактивные интермедиаты восстановления кислорода, которые могут не только модифицировать белки, нуклеиновые кислоты и полиненасыщенные жирные кислоты, но и опосредовать передачу сигнала запрограммированной гибели клеток, что приводит к нарушению клеточного состава и структурным повреждениям мышц, а также к функциональным нарушениям, в том числе к саркопении и мышечной слабости у пожилых.

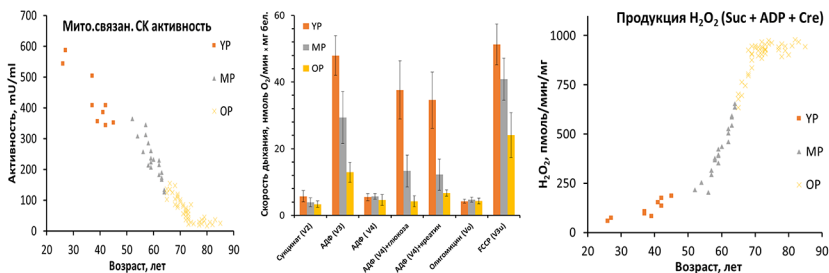
Ранее было показано, что митохондрии – органеллы, производящие в клетке наибольшее количество АТФ и АФК, – оснащены универсальным механизмом, который может полностью предотвратить митохондриальную продукцию АФК. Этот механизм заключается в легкой деполяризации внутренней митохондриальной мембраны для снижения мембранного потенциала до уровня, достаточного для образования АТФ, но недостаточного для образования АФК. Оказалось, что активация митохондриальных/цитозольных изоформ креатинкиназы, опосредованная циклами фосфорилирования/дефосфорилирования креатина, приводит к снижению  $\Delta\psi$  при рефосфорилировании АДФ митохондриальной АТФ-синтетазой. Однако эта деполяризация довольно мала, поскольку синтез АТФ из АДФ и  $P_i$  становится невозможным, если  $\Delta\psi$  (изначально  $\sim 190$  мВ) уменьшается до  $\sim 140$  мВ [3-5]. Поэтому эффект, вызванный активацией митохондриальной креатинкиназы, был назван мягкой деполяризацией.

Оказалось, что, в то время как для короткоживущих мышей старение сопровождается быстрой инактивацией механизма мягкой деполяризации, у долгоживущих голых землекопов и летучих мышей мягкая деполяризация в течение всей жизни плавно снижается, что позволяет компенсаторным механизмам частично нивелировать эффект сдвига баланса продукции и утилизации АФК [4]. Однако, оставалось не до конца изученным, как эта система реализована в организме человека при старении.

**Материалы и методы.** В рамках представленного исследования мы проанализировали состояние креатинового челнока в выделенных митохондриях биопсий четырехглавой мышцы бедра ( $N = 81$ ) и вызываемой его работой мягкой деполяризации, ассоциированной с низким уровнем продукции АФК и перекисного окисления липидов. Пробы мышечной ткани были взяты из наружной головки четырёхглавой

мышцы бедра у пациентов с первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава (от 26 до 85 лет) – модель старения на фоне хронического воспаления и выраженного снижения двигательной активности, а также молодых здоровых добровольцев (от 25 до 43 лет). В работе использовали методы спектрофотометрического определения ферментативной активности креатинкиназы по Бюхнеру, полярографии с электродом Кларка, флюориметрического определения перекиси водорода с пероксидазой хрена и резорфуфином, тонкослойной хроматографии.

**Результаты и обсуждение.** Нами было показано, что пациенты молодой группы (YP – young patients) по параметру снижения продукции АФК митохондриями в ответ на креатин/АДФ достоверно не отличаются от группы сравнения, в то время как между пациентами молодой, средневозрастной (MP – middle age patients) и старческой группами (OP – old age patients) выражены различия как по содержанию, так и по активности креатинового челнока (на рис. 1, слева), дыханию в присутствии креатина (рис. 1, в центре), эффекту генерации митохондриальных АФК (на рис. 1, справа) и содержанию монолизокардиолипина – маркера повреждения митохондриальных липидов (не представлено).



**Рис. 1.** Различия функционального состояния митохондрий, выделенных из скелетных мышц человека, при старении.

Полученные данные согласуются с современной литературой, постулирующей, что повреждение свободными радикалами и снижение выработки энергии являются характерными признаками процесса старения. Кроме того, наши результаты способствуют выявлению общих патологических путей, участвующих как в старении, так и в развитии дегенеративных заболеваний.

Работа была поддержана грантом РНФ номер 21-15-00405 «Регуляция митохондриального биогенеза в скелетной мышце при изменении уровня двигательной активности и старении» и выполнялась в рамках госзадания МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Maldonado E., Morales-Pison S., Urbina F., Solari A.* // *Antioxidants* (Basel). 2023. 12(3): 651.
2. *D'Egidio F., Castelli V., Cimini A., d'Angelo M.* // *Antioxidants* (Basel). 2023. 12(3): 571.
3. *Santiago A.P., Chaves E.A., Oliveira M.F., Galina A.* // *Biochimie*. 2008. 90: 1566-77.
4. *Vysokikh M.Y., Holtze S., Averina O.A. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. 117(12): 6491-501.
5. *Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A.* // *FEBS Lett*. 1997. 416: 15-8.

### МОДУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА ЗА СЧЕТ АКТИВАЦИИ Nrf2

*Гуреев А.П.<sup>1,2</sup>, Понов В.Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

**Аннотация.** Было показано, что у старых мышей снижаются показатели как долговременной, так и рабочей памяти, что совпадает со снижением экспрессии генов, связанных с митохондриальным биогенезом и регулируемых Nrf2/ARE сигнальным каскадом. Было изучено влияние активаторов Nrf2 на митохондриальный биогенез и когнитивные функции 15-месячных мышей. Ресвератрол активирует Nrf2, вероятно за счет активации Sirt1, который деацетилирует и активирует Nrf2. Метиленовый синий способен осуществлять в митохондриях альтернативный транспорт электронов, что, вероятно, тоже приводит к активации Nrf2/ARE сигнального пути и вызывает активацию митохондриального биогенеза.

**Введение.** Снижение когнитивных способностей является неспецифическим симптомом, который отмечается при многих возрастных заболеваниях головного мозга. Общим для всех подобных патологий является выраженное снижение нейрональной пластичности, что во многом обусловлено митохондриальными дисфункциями. Митохондриальные дисфункции включают в себя нарушение энергетического метаболизма, снижение продукции АТФ, гиперпродукцию активных форм кислорода, дисфункции в метаболизме кальция, открытие пор проницаемости, индукцию апоптоза и т.д. [1]. В последние годы стали накапливаться данные, указывающие на ключевую роль Nrf2/ARE сигнального пути в поддержании и формировании долговременной памяти. У животных с нокаутом Nrf2<sup>-/-</sup> отмечалось

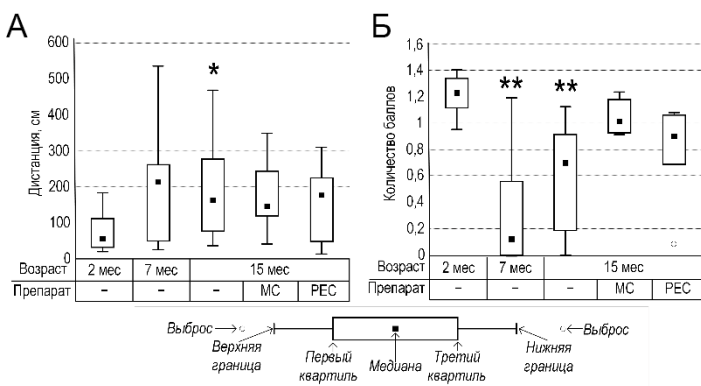
нарушение долговременной потенциации, что связано с нарушением нейрогенеза в гиппокампе [2]. Нейроны с нокаутом Nrf2<sup>-/-</sup> имели пониженную синаптическую плотность и дендритную арборизацию [3]. Также известна важнейшая роль Nrf2/ARE сигнального пути в поддержании митохондриальной стабильности. Данный сигнальный путь играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной защите, метаболизме лекарств и ксенобиотиков, которые зачастую нацелены на митохондрии и мтДНК [4], системах репарации ДНК, в том числе и мтДНК [5], и в регуляции количества митохондрий в ткани за счет митохондриального биогенеза и митофагии [6]. Однако остается открытым вопрос насколько Nrf2-регулируемый митохондриальный биогенез важен для поддержания когнитивных свойств при возрастном нарушении. В данном исследовании рассматривается два способа активации Nrf2 с помощью природного соединения – ресвератрола и синтетического препарата – метиленового синего в контексте их влияния на митохондриальный биогенез при старении мышей.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовались мыши линии C57BL/6 возрастом 2, 7 и 15 месяцев. Часть 15-месячных мышей получали предварительно с питьевой водой в течение двух месяцев растворы метиленового синего в концентрации 15 мг/кг/день и ресвератрол в концентрации 20 мг/кг/день. Для оценки долговременной памяти и рабочей памяти мышей использовал протокол описанный Vorhees and Williams (2006) [7]. РНК и тотальная ДНК были изолированы из гиппокампа мышей. Экспрессию генов оценивали с помощью RT-ПЦР в реальном времени на термоциклере CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Количество копий мтДНК также оценивалось с помощью ПЦР в реальном времени. Нормализованный уровень экспрессии и количество копий мтДНК рассчитывались по формуле  $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ . В качестве референса использовался ядерный ген *Gapdh*.

Изолированные митохондрии из гиппокампа мышей были получены с помощью дифференциального центрифугирования гомогената гиппокампа с добавлением 0.2% дигитонина. Измерение мембранного потенциала и скорости продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> проводилось на спектрофлуориметре Hitachi F-7000 по интенсивности флуоресценции катионного красителя Сафранина О (Sigma-Aldrich, США). Снижение флуоресценции Сафранина О свидетельствовало о его проникновении внутрь митохондрии в обмен на H<sup>+</sup>, что соответствует генерации мембранного потенциала. Для измерения продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> использовался Amplex Ultra Red (Invitrogen, США) и пероксидаза хрена (ThermoFisher Scientific, США). Кинетика образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определялась по изменению интенсивности флуоресценции резорурфина, образующегося в ходе реакции.

**Результаты и обсуждение.** С помощью водного лабиринта Морриса было изучено влияние возраста на долговременную и рабочую память у мышей возрастом два, семь и пятнадцать месяцев, а также влияние активаторов Nrf2 на когнитивные параметры 15-месячных мышей.

Долговременную память оценивали по расстоянию, которое мыши преодолевали в лабиринте в поисках платформы после 10 дней обучения. Наименьшее расстояние в поисках платформы проплывали 2-месячные мыши. Большее расстояние покрывали 7-месячные мыши (но различия с 2-месячными мышами статистически недостоверны,  $p = 0.07$ ) и 15-месячные мыши ( $p < 0.05$ ). При этом у мышей, которые в течение 8 недель употребляли метиленовый синий, расстояние, которое они проплывали в поисках платформы, не отличалось от показателей, которые демонстрировали 2-месячные мыши ( $p = 0.09$  при сравнении группы 2 месяца и 15 месяцев+метиленовый синий и  $p = 0.43$  при сравнении групп 2 месяца и 15 месяцев+ресвератрол). Это может свидетельствовать о том, что оба химических соединения частично нивелируют возрастные изменения в долговременной памяти (рис. 1А).



**Рис. 1.** Показатели долговременной памяти (А) и кратковременной памяти (Б). Различия статистически достоверны по сравнению с 2-месячными мышами (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ ).

Похожие результаты были получены при исследовании рабочей памяти, которая оценивались в баллах, которые начислялись в зависимости от времени поиска платформы в первой (обучающей) и второй (тестовой попытке). Наибольшее количество баллов было у 2-месячных мышей. Значительно меньше баллов получили 7-месячные мыши ( $p < 0.01$ ) и 15-месячные мыши ( $p < 0.01$ ). У 15-месячных мышей, употреблявших метиленовый синий, медианное количество баллов составило 1.02 (0.92; 1.81), а у мышей получавших ресвератрол 0.90 (0.68; 1.05), что статистически не отличается от 2-месячных мышей ( $p = 1$  и  $p = 0.14$ , соответственно) (рис. 1Б).



**Табл. 1.** Уровень экспрессии генов и количество копий мтДНК.

	2 мес	7 мес	15 мес	15 мес+МС	15 мес+РЕС
<i>Nfe2l2</i>	0.55±0.17	0.19±0.02	0.08±0.02*	0.40±0.08 <sup>##</sup>	0.25±0.06 <sup>#</sup>
<i>Sirt1</i>	1.95±0.39	1.29±0.46	0.57±0.14*	0.91±0.31	1.64±0.34
<i>Ppargc1a</i>	3.20±0.44	1.92±0.45	0.84±0.16**	1.84±0.25	2.99±0.41 <sup>#</sup>
<i>Tfam</i>	0.80±0.20	1.99±0.21	1.55±0.42	1.27±0.37	1.16±0.36
<i>Nrf1</i>	2.75±0.56	1.95±0.59	0.63±0.24*	3.39±0.82	1.44±0.50
<i>Cox1</i>	2.87±0.49	2.79±0.56	0.84±0.20*	2.85±0.73 <sup>#</sup>	2.23±0.77
Уровень мтДНК	3.24±0.49	2.46±0.47	0.96±0.27**	3.30±0.77 <sup>#</sup>	1.20±0.52

Различия статистически достоверны по сравнению с 2-месячными мышами (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ ), по сравнению с 15-месячными мышами (<sup>#</sup> –  $p < 0/05$ , <sup>##</sup> –  $p < 0.01$ ).

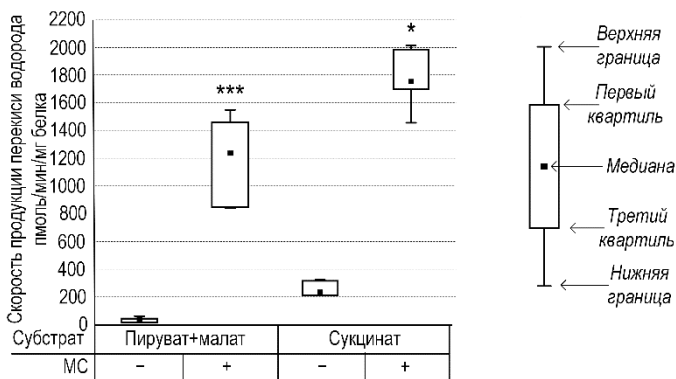
Вероятно, что возрастные ухудшения в памяти связаны с дисфункцией Nrf2/ARE сигнального пути, который играют важнейшую роль в поддержании митохондриального гомеостаза [8]. Мы обнаружили возрастное снижение экспрессии гена *Nfe2l2* в гиппокампе мышей. Так как промотор гена *Nfe2l2* содержит ARE и Nrf2 образует положительную петлю обратной связи [9], можно говорить о том, что снижение экспрессии гена *Nfe2l2* связано со снижением его активности.

И ресвератрол, и метиленовый синий вызывали увлечение экспрессии гена *Nfe2l2* в гиппокампе 15-месячных мышей (табл. 1). Но, по всей видимости, механизм активации Nrf2 двумя этими соединениями различается. Известно, что ресвератрол вызывает конформационные изменения SIRT1, которые влияют на его активность и специфичность к ацетилированным субстратам [10]. SIRT1, в свою очередь, деацетилирует Nrf2, что вызывает его активацию [11]. Nrf2 может связываться с ARE участками, расположенными в промоторных регионах гена *SIRT1*, и увеличивать его экспрессию [12]. Мы показали, что ресвератрол увеличивает экспрессию как гена *Sirt1*, так и гена *Nfe2l2* у 15-месячных мышей. Вероятно, это опосредует протекторный эффект ресвератрола. Кроме того, мы обнаружили, что ресвератрол вызывал значительное увеличение экспрессии гена *Ppargc1a*, который кодирует транскрипционный фактор PGC-1 $\alpha$ , который с начала века известен как «мастер регуляции митохондриального биогенеза». Он регулирует экспрессию NRF1 и GABP (также известен, как Nrf2, – nuclear respiratory factor, не следует путать с Nrf2 – nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Как NRF1, так и GABP связываются с промоторными зонами гена *TFAM* и *TFB2M*, продукты которых являются важными элементами, регулирующих транскрипцию митохондриальных генов [13].

Тем не менее, в последние годы стали появляться сообщения, что PGC-1 $\alpha$  является не единственным и, вероятно, даже не главным регулятором митохондриального биогенеза. Nrf2 также способен регулировать экспрессию *Nrf1*, так как его промотор имеет ARE [6]. И

метиленовый синий, и ресвератрол увеличивали экспрессию гена *Nrf1*. Однако только метиленовый синий индуцировал увеличение количества копий мтДНК и количества транскриптов митохондриальных генов. По всей видимости, индукция митохондриального биогенеза, вызванная метиленовым синим, связана с его способностью активировать Nrf2.

Нет убедительных данных, каким именно образом метиленовый синий может активировать Nrf2. С одной стороны, известно, что метиленовый синий осуществляет альтернативный транспорт электронов, что сопряжено с увеличением скорости продукции перекиси водорода. Исследования на интактных митохондриях, полученных из гиппокампа мышей, показали, что добавление 1 мкМ метиленового синего способствует значительному увеличению скорости продукции  $H_2O_2$  (рис. 2), что сопоставимо с результатами, полученными ранее на мозге морских свинок [14]. Электроны, которые получает метиленовый синий от NADH (при использовании в качестве доноров электронов комбинации малат+пируват) или от сукцинатдегидрогеназного комплекса (при использовании в качестве доноров электронов сукцината), передаются, в том числе, и на кислород, что и является причиной продукции  $H_2O_2$ . Известно, что активные формы кислорода являются фактором, который способствует активации Nrf2, причем не только за счет окисления Keap1, но и за счет инактивации GSK-3 $\beta$  – другого негативного регулятора Nrf2 [6].



**Рис. 2.** Скорость продукции перекиси водорода в изолированных митохондриях гиппокампа мышей. Различия статистически достоверны мышами (\* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ).

Альтернативный перенос электронов на III комплекс ЭТЦ, цитохром *c*, или тем более на молекулярный кислород, будет ассоциирован с активацией несопряженного дыхания. В результате чего должна снижаться скорость продукции АТФ, что должно приводить к

активации АМРК. Было показано, что уже через час после обработок клеток раствором метиленового синего уровень р-АМРК увеличивается более чем в два раза [15]. АМРК фосфорилирует Nrf2 и способствует его транслокации в ядро для увеличения экспрессии генов. Мы показали, что метиленовый синий индуцировал у 15-месячных мышей увеличение экспрессии *Nfe2l2*, *Nrf1*, а также увеличение уровня экспрессии генов, кодируемых митохондриальным геномом, и уровень мтДНК (табл. 1).

Стоит отметить, что ни метиленовый синий, ни ресвератрол не влияли на экспрессию *Tfam*. При этом минимальная экспрессия *Tfam* была у 2-месячных мышей, тогда как увеличенная наблюдалась у 7-месячных и 15-месячных мышей. Возрастное увеличение экспрессии *Tfam* было показано и ранее [16]. При этом наоборот уровень транскриптов генов, кодируемых мтДНК был наиболее снижен у 15-месячных мышей. Эти результаты с одной стороны противоречат сведениям о том, что TFAM необходим для инициации процессов транскрипции мтДНК. С другой стороны известно, что TFAM обладает способностью связываться не только с регуляторной областью D-петли, но и с другими участками мтДНК, вызывая образование петель и способствуя суперспирализации мтДНК [17]. Неудивительно, что TFAM-индуцированная суперспирализация мтДНК вызвала снижение экспрессии митохондриальных генов у 15-месячных мышей (табл. 1).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sharma C., Kim S., Nam Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(9): 4850.
2. Robledinos-Antón N., Rojo A.I., Ferreiro E. et al. // Redox Biol. 2017. 13: 393-401.
3. Zweig J.A., Caruso M., Brandes M.S., Gray N.E. // Exp. Gerontol. 2020. 131: 110767.
4. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // Trends Biochem. Sci. 2014. 39(4): 199-218.
5. Samoylova N.A., Gureev A.P., Popov V.N. // Int. J. Mol. Sci. 2023. 24: 6118.
6. Gureev A.P., Shaforostova E.A., Popov V.N. // Front. Genet. 2019. 10: 435.
7. Vorhees C.V., Williams M.T. // Nat. Protoc. 2006. 1(2): 848-58.
8. Shilovsky G.A., Ashapkin V.V. // Biochemistry (Mosc). 2022. 87(12): 1477-86.
9. Kwak M.K., Itoh K., Yamamoto M., Kensler T.W. // Mol. Cell. Biol. 2002. 22(9): 2883-92.
10. Borra M.T., Smith B.C., Denu J.M. // J. Biol. Chem. 2005. 280(17): 17187-95.
11. Ding Y.W., Zhao G.J., Li X.L. et al. // Int. J. Mol. Med. 2016. 37(4): 1049-58.
12. Huang K., Gao X., Wei W. // Exp. Cell Res. 2017. 361(1): 63-72.
13. Scarpulla R.C. // Physiol Rev. 2008. 88(2): 611-38.
14. Tretter L., Horvath G., Hölgyesi A. et al. // Free Rad. Biol. Med. 2014. 77: 317-30.
15. Atamna H., Atamna W., Al-Eyd G. et al. // Redox Biol. 2015. 6: 426-35.
16. Picca A., Pesce V., Fracasso F. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. 1840(7): 2184-91.
17. Campbell C.T., Kolesar J.E., Kaufman B.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. 1819: 921-9.

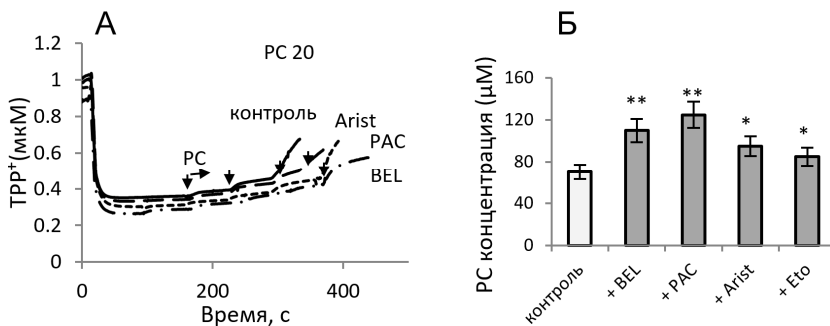
# УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ $\text{Ca}^{2+}$ -НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ $\text{iPLA2}$ В ИНДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫМИ АЦИЛКАРНИТИНАМИ

*Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынник В.В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук, Пущино, Россия

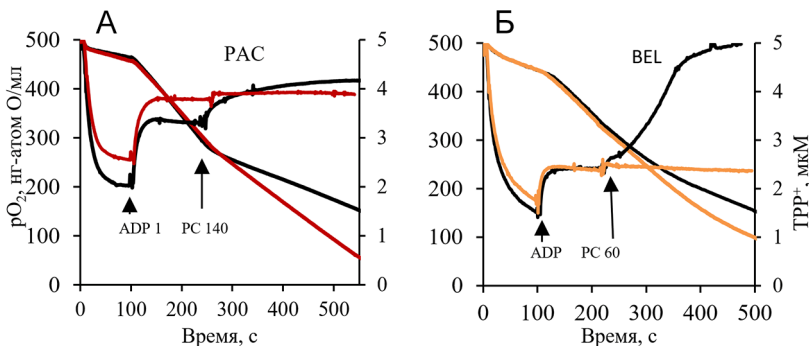
**Введение.** Индукция митохондриальной циклоспорин А - зависимой поры играет важную роль в гибели клеток [1-4]. Кальций рассматривается в качестве основного индуктора этой поры. Однако, хорошо известно, что в условиях ишемии-реперфузии концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в очаге поражения клеток могут превышать десятки мкМ [5,6]. Исследования последних лет показывают, что LCAC и соответствующие Ацил-КоА могут накапливаться в постишемических митохондриях в больших концентрациях [7]. В период после ишемии-реперфузии и при сердечной недостаточности, кроме активации СаМКПд,  $\text{sPLA2}\alpha$  и  $\text{PLC}\beta,\gamma$ , усиливается также активность  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой фосфолипазы А2 ( $\text{iPLA2}\gamma$ ), что способствует индукции поры кальцием [8-11]. Однако, участие фосфолипазы  $\text{iPLA2}\gamma$  в индукции поры посредством LCAC изучено недостаточно. Поэтому задачей нашей работы было исследование вклада  $\text{iPLA2}\gamma$  в индукцию поры пальмитоилкарнитином. Условия выделения митохондрий и проведения экспериментов описаны ранее [12].

**Результаты.** Рисунок 1 (панели А, Б) характеризует влияние D,L-пальмитоилкарнитина (PC) на митохондриальный потенциал  $\Delta\Psi\text{m}$  в Состоянии 2 (без ADP). Репрезентативные кривые представлены на рис. 1А. В контроле три последовательные добавки 20 мкМ PC вызвали диссипацию  $\Delta\Psi\text{m}$  (TRP+), обеспечивая критическую величину  $\text{PC}^* = 60$  мкМ (сплошная линия). Введение в среду инкубации 25 мкМ Aristolochic acid (Arist), ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $\text{sPLA2}$ , увеличивало величину  $\text{PC}^*$  до 80 мкМ (пунктир). Лучший защитный эффект наблюдался в присутствии (R/S)-bromoenol lactone (BEL, 25 мкМ) и PACOCF3 (PAC, 25 мкМ), ингибиторов  $\text{iPLA2}\gamma$ . В присутствии этих ингибиторов критическая концентрация  $\text{PC}^*$  превышала 100 мкМ (пунктир и точечная кривая). Средние величины  $\text{PC}^*$  для Arist, BEL и PAC составляли 95, 110 и 125 мкМ, соответственно (панель б). Ингибирование карнитин пальмитоилтрансферазы-1 (CPT1) посредством Etomoxir 2 (Eto, 25 мкМ) увеличивало  $\text{PC}^*$  до 85 мкМ. Наилучший защитный эффект обеспечивало ингибирование  $\text{iPLA2}\gamma$  посредством PAC, приводящее к увеличению  $\text{PC}^*$  на 60-75% в сравнении с контролем.



**Рис. 1.** Влияние ингибиторов фосфолипаз на мембранный потенциал при окислении сукцината и последовательных добавках 20 мкМ РС.

Критическая концентрация РС\*, при которой происходило полное набухание митохондрий, была 20 мкМ в контроле и возрастала до 50 мкМ в присутствии ингибитора *iPLA2γ* PAC (40 мкМ). Менее выраженным был защитный эффект ингибитора *sPLA2* Arist (РС\* = 40 мкМ), тогда как эффективность BEL и Eto (РС\* = 30 мкМ) не превышала 60% от величины защитного эффекта PAC. Сравнение этих величин также свидетельствует о высокой эффективности PAC в предотвращении набухания митохондрий. В сравнении с контролем (РС\* = 20 ± 4 мкМ), ингибирование *iPLA2γ* посредством PAC увеличивало РС\* более чем в 2.5 раза, до 50-60 мкМ. Таким образом, снижение ΔΨ<sub>m</sub> и активация набухания в присутствии РС происходят с вовлечением фосфолипазы *iPLA2γ*.



**Рис. 2.** Влияние РС на митохондриальный потенциал и дыхание митохондрий в состоянии 3 в присутствии ингибиторов фосфолипаз PAC (красная линия) и BEL (желтая линия).

Рисунок 2 показывает влияние РС на ΔΨ<sub>m</sub> и дыхание митохондрий в состоянии 3 (ADP + НК). в присутствии в среде ингибиторов фосфолипазы *iPLA2γ*. Средняя критическая концентрация РС\*,

приводящая к диссипации  $\Delta\Psi_m$  при окислении пирувата и L-глутамата, составляет 60-70 мкМ. В этих условиях Arist (50 мкМ) оказывает противоположный эффект, вызывая падение  $\Delta\Psi_m$  и ингибирование дыхания в присутствии допороговых концентраций PC. Сходный негативный эффект наблюдается при ингибировании CPT1. Ингибитор CPT1 Eto (20 мкМ) усиливает действие PC, ускоряя снижение  $\Delta\Psi_m$  и ингибируя дыхание митохондрий. В отличие от Arist и Eto, ингибиторы iPLA2 $\gamma$  BEL и PAC в Состоянии 3 также обеспечивают защитный эффект. Рис. 2Б показывает, что введение в среду инкубации 30 мкМ BEL предотвращает диссипацию  $\Delta\Psi_m$  в присутствии 80 мкМ PC. Ингибирование iPLA2 $\gamma$ , вызываемое 40 мкМ PAC, также приводит к реактивации дыхания и предотвращает диссипацию  $\Delta\Psi_m$  при действии 100-120 мкМ PC (панель А). Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что индукция поры избытком PC в состоянии 3 также происходит с вовлечением митохондриальной iPLA2 $\gamma$ .

**Обсуждение.** Ca<sup>2+</sup>-независимая фосфолипаза iPLA2 $\gamma$  локализована в митохондриях и пероксисомах [27] и активируется в присутствии высоких (мМ) концентраций Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> [28]. Активация iPLA2 $\gamma$  приводит к увеличению продукции арахидоновой кислоты (AA, C:20:4) и продуктов ее превращения – лейкотриенов и простагландинов. Как увеличение, так и подавление экспрессии iPLA2 $\gamma$  вызывает митохондриальные аномалии и дисфункцию, а также развитие ряда заболеваний [8-11]. Окислительный стресс и деэнергизация митохондрий могут приводить к активации iPLA2 $\gamma$ , накоплению AA, токсичных продуктов ее окисления и стимуляции Ca<sup>2+</sup> (CsA)-зависимой поры [13,14]. Ингибирование или нокаут iPLA2 $\gamma$  уменьшает вероятность открытия такой поры [15,16]. Ее активация при сердечной недостаточности или жировой диете приводит к активации липоксигеназного пути окисления AA в клетках сердца и печени и генерации токсичных 12-гидрокси-эйкозатетраеновых кислот (12-HEETE), участвующих в индукции поры. Эти данные позволяют считать сигнальный путь с участием липоксигеназы-12 (LOX-12) одним из важных сигнальных путей, участвующих в активации Ca<sup>2+</sup>-зависимой поры [17,18]. Представленные результаты показывают, что ингибирование iPLA2 $\gamma$  посредством BEL или PAC препятствует индукции митохондриальной поры пальмитолкарнитином. Противоречивые эффекты ингибиторов Ca<sup>2+</sup>-зависимой cPLA2 и CPT1 на  $\Delta\Psi_m$  в состояниях 2 и 3 отчасти могут быть связаны с их неспецифическим действием. Локализованная на внешней мембране митохондрий CPT1 участвует в превращении цитоплазматического пальмитойл-КоА в PC. Ее ингибирование посредством Eto не препятствует транспорту PC в митохондрии. Более того Eto усиливает токсическое действие PC на  $\Delta\Psi_m$

и вызывает ингибирование дыхания. Поэтому, использование Ето как протектора токсического действия свободных жирных кислот при реперфузии, может быть неэффективным. Таким образом, представленные данные указывают на то, что  $\text{Ca}^{2+}$ -независимая iPLA<sub>2</sub>γ может быть вовлечена в индукцию митохондриальной поры пальмитоилкарнитином. Механизмы прямой или опосредованной активации iPLA<sub>2</sub>γ и LOX-12 с участием карнитиновых и CoA производных жирных кислот пока неизвестны и могут представлять задачу для дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hunter D.R., Haworth R.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1979. 195(2): 468-77.
2. Crompton M, Ellinger H., Costi A. // Biochem. J. 1988. 255: 357-60.
3. Bernardi P., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. // J. Bioenerg. Biomembr. 1994. 26(5): 509-17.
4. Kwong J.Q., Molkentin J.D. // Cell. Metab. 2015.21(2): 206-14.
5. Ford D.A., Han X., Horner C.C., Gross W. // Biochemistry. 1996. 35(24): 7903-9.
6. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2001. 33(6): 1065-89.
7. Liepinsh E., Makrečka-Kuka M., Volska K. et al. // Biochem J. 2016. 473(9): 1191-202.
8. Hollander J.M., Thapa D., Shepherd D.L. // Am. J. Physiol. Circ. Physiol. 2014. 307: H1-14.
9. Caro A.A., Cederbaum A.I. // Arch. Biochem. Biophys. 2007. 457(2): 252-63.
10. Asemu G., Dhalla N.S., Tappia P.S. // Am. J. Physiol. Circ. Physiol. 2004. 287(6):H2598-605.
11. Hara S., Yoda E., Sasaki Y. et al. // Biochim Biophys Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. 2019. 1864(6):861-8.
12. Fedotcheva N.I., Grishina E.V., Dynnik V.V. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology 2022. 16(1): 72-8.
13. Moon S.H., Jenkins C.M., Liu X. et al. // J. Biol. Chem. 2012. 287(18):14880-95.
14. Kinsey G.R., McHowat J., Patrick K.S., Schnellmann R.G. // J. Pharmacol Exp Ther. 2007. 321(2): 707-15.
31. Rauckhorst A.J., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. // J. Lipid Res. 2014. 55: 826-36.
15. Williams S.D., Gottlieb R.A. // Biochem J. 2002. 362(Pt 1):23-32.
16. Moon S.H., Jenkins C.M., Kiebish M.A. et al. // J. Biol. Chem. 2012. 287(35): 29837-50.
17. Moon S.H., Liu H., Cedars A.M. et al. // J. Biol. Chem. 2018. 293(1):115-29.
18. Moon S.H., Dilthey B.G., Liu X. et al. // J. Lipid Res. 2021. 62:100052.

# АДАПТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА 1-КАРБОКСИ(1-N-(АЦЕТИЛАМИД)-2-(3',5'-ДИ-ТРЕР-БУТИЛ-4-ГИДРОКСИ-ФЕНИЛ)-ПРОПИОНАТА КАЛИЯ

*Жигачева И.В., Крикунова Н.И.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук, Москва, Россия

**Введение.** В условиях стресса приводит к смещению антиоксидантно – прооксидантного равновесия в сторону увеличения содержания АФК в клетке. При этом одним из основных источников этих интермедиатов являются митохондрии. Избыточная продукция АФК электрон-транспортными цепями способна привести к повреждению ДНК митохондрий (mtДНК), которая в отличие от ядерной ДНК не защищена гистонами [1,2]. В результате мутаций mtДНК, окислительного повреждения белков и активации перекисного окисления липидов может происходить нарушение энергообеспечения клеток, что, в конечном счете, приводит к патологическим изменениям [2,3]. В связи с этим можно было предположить, что препараты, повышающие устойчивость организма к действию стрессовых факторов (адаптогены), должны влиять на генерацию АФК этими органеллами. На эту роль в первую очередь претендуют антиоксиданты.

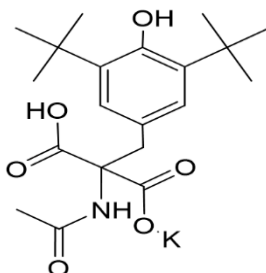
Отметим, что введение синтетических антиоксидантов в организм оказывает значительное влияние не только на процессы перекисного окисления липидов, но и на метаболизм природных антиоксидантов. Действие природных и синтетических антиоксидантов может складываться, результатом чего является повышение эффективности их защитного действия. Кроме того, введение синтетических антиоксидантов может оказывать влияние на синтез и утилизацию природных антиоксидантов, и, следовательно, вызывать изменения антиокислительной активности липидов [4]. Таким образом, синтетические антиоксиданты могут использоваться в биологии и медицине в качестве препаратов, воздействующих не только на процессы свободно радикального окисления, но и на систему природных антиоксидантов, влияя на изменение антиокислительной активности.

Эффективными перехватчиками радикалов служат фенольные антиокислители, включая пространственно затрудненные фенолы [5]. Антиоксидантные свойства фенолов связаны с наличием в их структуре слабых фенольных гидроксильных групп, которые легко отдают свой атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. В этом случае фенолы выступают в роли ловушек свободных радикалов, превращаясь сами в малоактивные феноксильные радикалы. При этом эффективность антиоксидантов зависит от дозы препарата нелинейно. В больших



концентрациях антиоксиданты являются прооксидантами т.е. они не ингибируют, а, активируют свободнорадикальные реакции [6]. Поэтому для антиоксидантов необходим подбор концентраций, обеспечивающих повышение устойчивости и животных и растительных организмов к стрессовым воздействиям.

В связи с этим в качестве объекта исследования был выбран препарат, являющийся пространственно-затрудненным фенолом калий анфен (1-карбокситетра-*tert*-бутил-2-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидрокси-фенил)пропионат калия):



Калий анфен.

Целью работы было также изучение функционального состояния митохондрий печени крыс в условиях стресса и влияние на него исследуемого препарата в широком диапазоне концентраций.

**Материалы и методы** Работу проводили на митохондриях печени крыс линии Вистар весом 100-120 г.

*Выделение митохондрий печени* проводили методом дифференциального центрифугирования [7]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g, 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения: 0.25 М сахароза, 10 мМ HEPES, pH 7.4.

*Скорости дыхания митохондрий* регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий содержала: 0.25 М сахарозу, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 2 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ KCl (pH 7.5) (28°C).

*Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ)* оценивали флуоресцентным методом [8]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax Horiba Yvon GmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм,

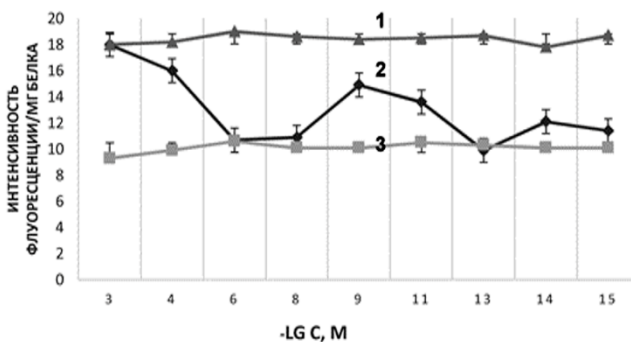
испускания – 420–470 нм Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии.

*Острая гипобарическая гипоксия* Моделирование острой гипобарической гипоксии у крыс линии Вистар весом 100–120 г. проводили в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления, (230.40 мм рт. ст.), что соответствует высоте 9000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5 тысяч метров (давление 405 мм рт. ст.) над уровнем моря. В каждую последующую минуту осуществляли «подъем» еще на одну тысячу метров. (Время пребывания крыс «на высоте» – 9.0 тыс. метров над уровнем моря – 5.0 минут).

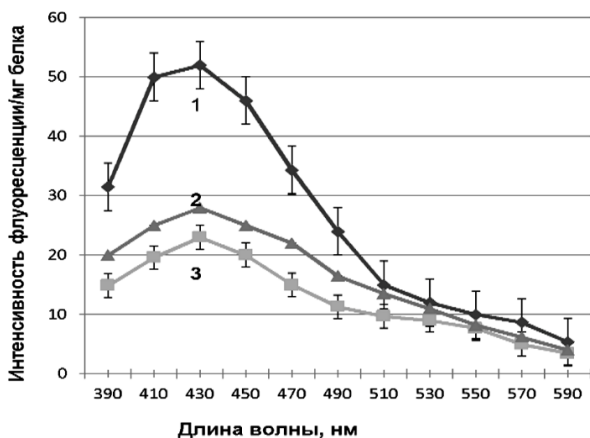
В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: сахароза, Трис, ЭДТА, FCCP, малат, глутамат, сукцинат, БСА, (свободный от ЖК) (Sigma Aldrich, США); NEPES (MP Biomedicals, Германия).

**Результаты и обсуждение.** В рамках задачи для исследования антистрессовых свойств препарата нами была разработана модель «старения» (длительная инкубация) митохондрий. Мы предположили, что длительная инкубация митохондрий в гипотонической среде при комнатной температуре будет приводить к активации ПОЛ. Для активации ПОЛ митохондрии печени крыс на 25 мин помещали в 0.5 мл среды, содержащей 70 мМ КСl, 10 мМ NEPES и 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4. Такая инкубация вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в 3–4 раза (рис. 1). Введение калий анфена в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции конечных продуктов ПОЛ.



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций калий анфена и «старения» на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ. 1 – «старение» 2 – «старение» митохондрий + различные концентрации калий анфена; 3 – контроль.

Препарат в концентрациях  $10^{-6}$ - $10^{-8}$ ,  $10^{-13}$  и  $10^{-15}$  М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня, что, возможно, указывало на антистрессовую активность калий анфена, наличие которой проверили на модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ). ОГГ приводила к 2.5-3-кратному увеличению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс. Введение животным  $10^{-6}$  моль/кг,  $10^{-13}$  моль/кг калий анфена за 45 минут до воздействия предотвращало активацию ПОЛ (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние гипобарической гипоксии (ОГГ) и калий анфена на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий. 1 – ОГГ; 2 – ОГГ+  $10^{-6}$  моль/кг калий анфен; 3 – контроль.

Препарат вызывал изменения в характеристиках дыхания и энергетического сопряжения митохондрий печени крыс (табл. 1). Уже через 45 мин. после введения животным  $10^{-13}$  моль/кг калий анфена скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ возрастали на 24.5%, а через 3 часа они превышали контрольные величины на 18% и спустя 6 часов – не отличались от контроля. При этом величина дыхательного контроля увеличивалась с  $2.26 \pm 0.10$  до  $3.00 \pm 0.10$  (спустя 45 мин после инъекции) и  $2.83 \pm 0.10$  (спустя 3 часа после инъекции).

Установлено, что в условиях стресса происходит снижение активности I комплекса дыхательной цепи митохондрий. При этом на 25% снижаются скорости окисления НАД-зависимых субстратов в фосфорилирующем состоянии (т.е. в присутствии АДФ) [9]. Отметим, что поддержание эффективной работы НАД-Н дегидрогеназного комплекса способствует повышению устойчивости организма к гипоксии [10,11]. Исходя из этих данных мы предположили, что калий анфен, повышая активность НАД-Н-дегидрогеназного комплекса способствует активации энергетического метаболизма клетки.

**Табл. 1.** Влияние калий анфена на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями печени крыс, нг-моль/мг белка×мин (число экспериментов – 10).

Группа	V <sub>0</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub>	V <sub>FCCP</sub>
Control	8.5 ± 1.9	24.2 ± 1.7	10.7 ± 0.5	2.26 ± 0.10	27.3 ± 1.1
Время, прошедшее после введения калий анфена					
45 мин	6.7 ± 2.0	30.1 ± 1.9	10.0 ± 0.6	3.00 ± 0.10	33.4 ± 1.8
3 часа	8.0 ± 1.5	28.6 ± 1.8	10.1 ± 0.8	2.83 ± 0.10	32.4 ± 2.0
6 часов	8.7 ± 1.9	25.0 ± 0.8	10.8 ± 1.5	2.31 ± 0.10	28.2 ± 1.9

Среда инкубации содержала: 0.25 М сахараза, 10 мМ трис-НСl, 2 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 мМ КСl, рН 7.5. Дополнительные добавки: 200 мкМ ADP, 10<sup>-6</sup> М FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенил-гидразон), 4 мМ глутамат, 1 мМ малат. Условные обозначения: V<sub>0</sub> – скорости окисления субстратов; V<sub>3</sub> – скорости окисления субстратов в присутствии АДФ; V<sub>4</sub> – скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ).

Активация ПОЛ в условиях стресса, вызывающая изменения функциональных характеристик митохондрий, отразилась и на физиологических показателях и, прежде всего, на выживаемости животных в условиях гипоксии. Продолжительность жизни животных в условиях различных видов гипоксии возрастала в 1.8-4.5 раза (табл. 2).

**Табл. 2.** Протекторная активность калий анфена-натрия (Представлены результаты 10 опытов)

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Калий анфен, моль/кг	
			10 <sup>-13</sup>	10 <sup>-6</sup>
Инъекция азида натрия 20 мг/кг	Время жизни в минутах	2.3±0.5	10.5±0.8	5.2±1.2
		0%	30%	40%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг	% выживших	20.5±3.1	38.6±5.3	35.7±6.4
		0%	20%	15%

Исходя из полученных данных можно предположить, что протекторная активность калий анфена обусловлена его антиоксидантными свойствами. Препарат, предотвращая активацию ПОЛ, вероятно, предупреждал изменение липид-белковых взаимодействий, а, следовательно, и активности связанных с мембранами ферментов. При этом, по-видимому, сохранялась высокая функциональная активность митохондрий, обеспечивающая устойчивость организма к действию стрессовых факторов

## ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. // Mol. Cell Proteomics. 2005. 4: 1122-33.
2. Тодоров И.Н. // Рос. хим. Журнал. 2007. 51: 93-106
3. Gladden J.D., Ahmed M.I., Litovsky S.H. et al. // Am. J. Med. Sci. 2011. 342: 114-9.
4. Иванов В.Г., Горленко В.А. Антиоксиданты. М.: Академия. 2009. 320 с.
5. Кемелева Е.А., Васинина Е.А., Сеницина О.И. и др. // Биоорганическая химия. 2008. 34(4): 558-69.
6. Бурлакова Е.Б. // Наука и жизнь. 2006. 2: 18-20.
7. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. // ВВА. 1977. 501: 415-23.
8. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. // Anal. Biochem. 1973. 52: 1-9.
9. Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M. et al. // Circ. Res. 2004. 94: 53-9.
10. Никонов В.В., Павленко А.Ю. // Медицина неотложных состояний. 2009. 3-4: 22-3.
11. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии. Москва: РАН. 2019. 201 с.

### ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА МЕТАБОЛИЗМ АТФ В ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

*Казаков М.С., Шитикова Е.Ю., Попов Д.Ю., Погонялова М.Ю.,  
Кузнецова Е.А., Винокуров А.Ю.*

Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники ОГУ имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

**Введение.** Клетки млекопитающих реализуют два основных пути производства АТФ – гликолиз и окислительное фосфорилирование (ОХРНOS). Ввиду существенное более высокого выхода АТФ последний процесс, протекающий в митохондриях, рассматривается в качестве основного. Однако реализация конкретного метаболического пути зависит от типа клеток и конкретных условий, в связи с чем многие ряд типов клеток, включая клетки многих злокачественных новообразований, характеризуется преимущественно гликолитическим путем синтеза АТФ [1,2].

Очевидно, что митохондриальная дисфункция, ассоциированная с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК), может оказывать существенное влияние на биоэнергетику клеток, в которых ОХРНOS обеспечивает синтез основной части АТФ [3]. Однако ввиду связи гликолиза с протекающими в митохондриях процессами, опосредованной малатным и глицерофосфатным челночными механизмами, повреждения мтДНК могут оказывать существенное влияние и на синтез АТФ в цитозоле [4]. Однако данный аспект является малоизученным ввиду ряда особенностей митохондриального генома – возможностью наличия в мтДНК одновременно нескольких мутаций генов белков

электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и/или системы синтеза белков в матриксе митохондрий, а также присутствием в клетке как мутантных молекул мтДНК, так и молекул дикого типа. В связи с этим целью данной работы является исследование влияния комплекса мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) на продукцию АТФ в преимущественно гликолитических клетках.

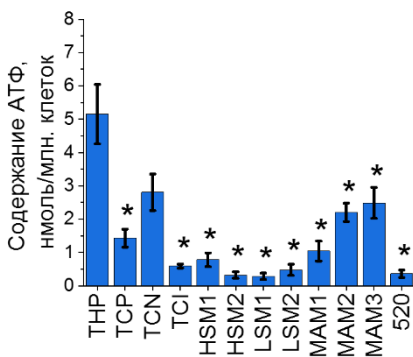
**Материалы и методы.** Объектами изучения выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов) (TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2, MAM3, 520), которые были получены на основе клеток THR-1, характеризующихся преимущественно гликолитическим путем синтеза АТФ [5]. Каждая из линий имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК с разным уровнем гетероплазмии, затрагивающих гены MT-ND1 (m.3336T>C), MT-ND2 (m.5178C>A), MT-ND5 (m.13513G>A), MT-ND6 (m.14459G>A), MT-CYTB (m.15059G>A и m.14846G>A), MT-RNR1 (del652G и m.1555A>G), MT-TL2 (m.3256C>T и m.12315G>A).

Для анализа физиологического уровня АТФ применяли люциферазный метод с применением набора определения АТФ (LifeTechnologies, США). Оценку времени истощения запасов АТФ при блокировании синтеза макроэрга использовали флуоресцентный зонд Mag-Fura-2 AM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США). После инкубирования в растворе зонда клетки отмывали и проводили оценку изменения соотношения интенсивности флуоресценции связанной и свободной форм Mag-Fura-2 в присутствии олигомицина А (Sigma-Aldrich, США) и йодуксусной кислоты (Acros Organics, Индия) для блокирования гликолиза и окислительного фосфорилирования соответственно. Исследование митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) проводили с применением флуоресцентного зонда TMRM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 25 нМ. Величину  $\Delta\Psi_m$  рассчитывали на основании величины изменения интенсивности флуоресценции TMRM после разобщения с помощью 2 мкМ FCCP (Sigma-Aldrich, США). Оценку  $\Delta\Psi_m$  и времени расходования запасов АТФ проводили с использованием метода широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для исследования скорости дыхания клеток использовали респирометр Oxuytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания). В качестве среды для измерения использовали HBSS с содержанием глюкозы 10 мМ. В ходе изучения выполняли анализ базовой скорости потребления кислорода, а также скорости после внесения ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А (2 мкг/мл).

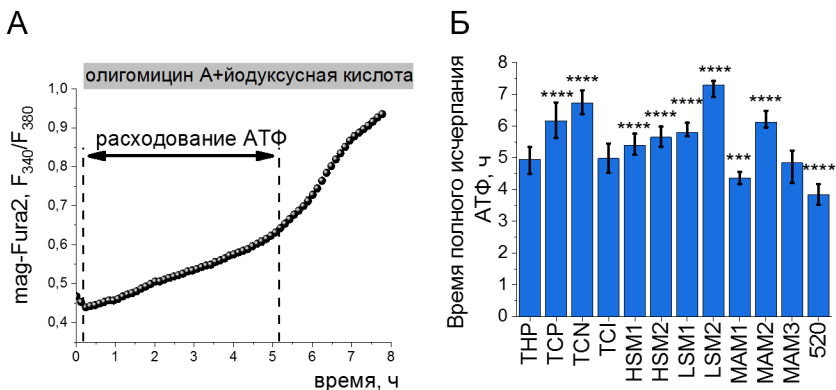
Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Origin 2019 (Microcal Software Inc., США). Полученные числовые данные по тексту представлены в виде «медиана (квартиль 1 (Q1); квартиль 3 (Q3))». На рисунках, отражающих значения проанализированных параметров для разных клеточных линий, результаты приведены в виде гистограмм, высота столбцов которых

соответствует медиане, а внутренние ограничители – квартилям 1 и 3 (если не указано иное). Статистическую значимость различий между результатами для клеточной линии THP и линиями гибридов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при различных уровнях значимости (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Результаты и обсуждение.** Исследование содержания количества АТФ в клетках показало, что практически все линии статистически достоверно имеют сниженное содержание макроэрга в сравнении с THP (от 1,9-кратного для TCN до 19-кратного для LSM1), кроме линии TCN (рис. 1).



**Рис. 1.** Содержание АТФ в исследуемых клеточных линиях.

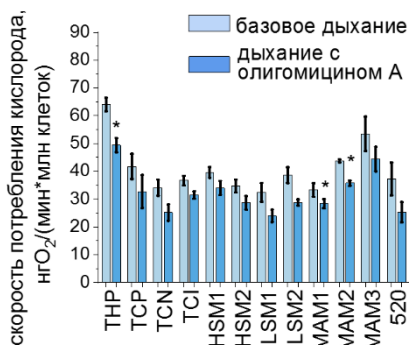


**Рис. 2.** Время истощения АТФ в исследуемых линиях. А. Пример экспериментальной кривой изменения соотношения интенсивностей флуоресценции связанной и свободной форм зонда; Б. Результаты статистического анализа времени потери способности клеток к поддержанию градиента концентрации ионов кальция относительно цитоплазматической мембраны.

Такое различие в содержании АТФ может быть следствием как нарушения работы комплексов ЭТЦ, так и повышенного потребления АТФ [6]. Для проверки роли изменений в протекании энергопотребляющих процессов были проведены ратиометрические исследования с применением зонда mag-Fura-2 (рис. 2).

Исследуемые гибриды характеризуются различным распределением относительно ТНР показателя времени полного исчерпания АТФ при блокировании его синтеза. В случае линий МАМ1 и 520 наблюдается снижение показателя (4.36 и 3.84 соответственно), в то время как для линий TCP, TCN, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, МАМ2 – увеличение (6.16, 6.73, 5.4, 5.65, 5.8, 7.3 и 6.12 ч соответственно), которое, однако, не может объяснить приведенные на рисунке 1 различия. Таким образом различия уровня АТФ в клетках большей степени определяются изменениями скорости продукции макроэрга.

Для оценки вклада окислительного фосфорилирования в продукцию АТФ были проведены респирометрические исследования, результаты которых приведены на рис. 3.



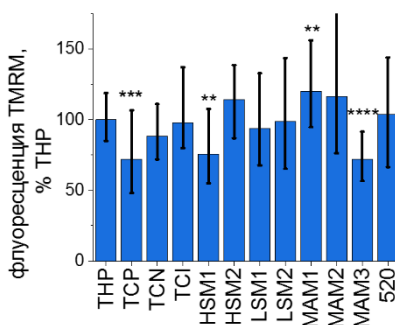
**Рис. 3.** Скорости базового и сопряженного с синтезом АТФ дыхания.

Как видно из представленных на рис. 3 данных, весьма малая часть дыхания связана с синтезом АТФ (для линий ТНР, TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, МАМ1, МАМ2 и МАМ3 снижение относительно базового уровня скорости дыхания после внесения олигомицина А составило 22.88%, 21.55%, 26.25%, 14.2%, 14.13%, 17.37%, 26.02%, 25.45%, 14.79%, 18.28%, 16.92% и 32% соответственно. Кроме того, корреляционный анализ показывает высокий уровень связи между содержанием в клетках АТФ и скоростями базового (коэффициент Спирмена составил 0.58 при  $p = 0.04$ ) и разобщенного (0.58 при  $p = 0.04$ ), но не сопряженного с синтезом АТФ дыхания (0.19 при  $p = 0.57$ ). Приведенные результаты позволяют говорить о том, что в клетках как линии ТНР, так и созданных на ее основе цитоплазматических гибридов



потребности в АТФ обеспечиваются преимущественно за счет гликолиза, а роль митохондрий может быть в большей степени связана с утилизацией образующегося в ходе его реализации пирувата, а также окислением цитозольного НАДН с регенерацией НАД. Вероятно, именно с изменениями в скорости последних двух процессов вследствие нарушений функции ЭТЦ, связанной с мутациями мтДНК, и связаны различия в биоэнергетических параметрах исследуемых клеток с идентичной ядерной ДНК.

С учетом различий по набору мутаций и уровням их гетероплазии, механизмы развития митохондриальной дисфункции в разных линиях цибридов должны иметь свои особенности, которые характеризуются как увеличением, так и снижением  $\Delta\Psi_m$  (рис. 4).



**Рис. 4.** Сравнение величины  $\Delta\Psi_m$  в клетках цитоплазматических гибридов и линии T9P.

Из исследуемых мутаций изменения генов, кодирующих I и III комплексы ЭТЦ, являются наиболее значимыми в работе ЭТЦ: мутации I (m.5178C>A, m.13513G>A, m.14459G>A) и III комплекса (m.14846G>A, m.15059G>A), нарушают структуру белков и оказывают влияние на их биологические функции [7-10]. Помимо мутаций самих комплексов, на функционирование ЭТЦ, а следовательно и на развитие гликолиза, могут оказывать влияние некоторые мутации рРНК (m.1555A>G) и тРНК (m.3256C>T), нарушающие процесс синтеза белка [11,12].

Таким образом, несмотря на невысокий вклад ОХРНOS на общую продукцию АТФ в исследуемых клетках, нарушение функционирования ЭТЦ под влиянием мутаций мтДНК оказывает существенное влияние на внутриклеточный энергетический баланс.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00317).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Wilson D.F.* // *J. Physiol.* 2017. 595(23): 7023-38.
2. *Medeiros H.C.D., Lunt S.Y.* // *Mol. Cell.* 2022. 82(17): 3119-21.
3. *Khotina V.A. et al.* // *Biomedicines.* 2023. 11(2): 532.
4. *Novikov V. et al.* // *Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther.* 2020. 17: 31-42.
5. *Mehrotra P. et al.* // *PLoS Pathog.* 2014. 10: e1004265.
6. *Khan N. et al.* // *Indian J. Med. Res.* 2015. 141: 13-26.
7. *Ronchi D. et al.* // *BMC Neurol.* 2011. 11: 85.
8. *Andreu A.L. et al.* // *N. Engl. J. Med.* 1999. 341(14): 1037-44.
9. *Sazonova M. et al.* // *Atherosclerosis.* 2021. 331: e99.
10. *Sun C. et al.* // *Front. Neurol.* 2021. 12: 601307.
11. *Wu C.-C. et al.* // *Ear Hear.* 2007. 28(3): 332-42.
12. *Ryzhkova A. et al.* // *Atherosclerosis.* 2018. 275: e254.

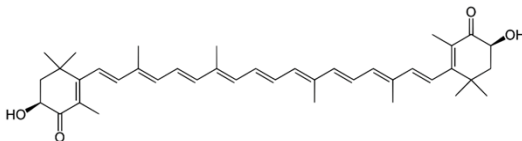
### ВЛИЯНИЕ АСТАКСАНТИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ИЗОПРОТЕРИНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

*Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Одинокова И.В.,  
Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук, Пушкино, Россия

**Введение.** Сердечная недостаточность представляет собой совокупность расстройств, которые обусловлены в основном низкой сократительной способностью сердечной мышцы – миокарда. Это такое состояние сердца и сосудистой системы, при котором невозможно полноценно обеспечивать организм кислородом и питательными веществами в соответствии с потребностями метаболизма, или же это обеспечение достигается усиленным напряжением компенсаторных сил организма. В результате нарушения питания, гипоксемии и гипоксии развиваются необратимые нарушения и изменения во внутренних органах. Заболевания сердца являются одной из причин, из-за которой возникает нарушение мозгового кровообращения, в результате чего нарушается кровоток в артериях и уменьшается кровоснабжение мозга. Митохондрии принимают участие в заболеваниях различной этиологии. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий – важнейшая предпосылка для нормальной функции клетки. Митохондриальная дисфункция приводит к развитию различных патологий, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые, сахарный диабет,

различные форм поражения печени и костно-мышечной системы, сепсиса, психические расстройства [1]. В свою очередь, митохондриальная дисфункция может вызывать окислительный стресс. Окислительный стресс является одной из причин возникновения различных заболеваний у человека [2]. Снизить окислительный стресс способны антиоксиданты [3]. Одним из интересных для исследования антиоксидантов является астаксантин (АСТ) (рис. 1).



**Рис. 1.** Структурная формула астаксантина.

АСТ имеет уникальную молекулярную структуру, которая позволяет ему оставаться как внутри, так и вне клеточной мембраны [4]. Известно, что АСТ значительно ослабляет митохондриальную дисфункцию, связанную с ишемическим повреждением миокарда, может снижать окислительный стресс [5] и предотвращает развитие сердечно-сосудистых заболеваний [6-8]. Ранее, мы показали, что АСТ снижал дегенерацию, отек мышечных волокон сердца и степень фиброзного повреждения миокарда после введения изопротеренола (ИЗО). Кроме того, АСТ улучшал функциональное состояние митохондрий сердца у крыс сердечной недостаточностью, вызванной ИЗО. Введение АСТ в сочетании с инъекцией ИЗО увеличивало дыхательный контроль (показатель работоспособности митохондрий, ДК) в митохондриях сердца крыс. Кроме того, АСТ повышал  $Ca^{2+}$  ёмкость и снижал скорость набухания митохондрий, что замедляло открытие поры неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, мРТР), т.е. снижало проницаемость митохондриальной мембраны [7,8]. Когда митохондрии повреждены, слияние (fusion) митохондрий способно снимать стресс, позволяя функциональным митохондриям дополнять дисфункциональные митохондрии путем диффузии и обмена компонентами между органеллами. Деление (fission) необходимо для создания новых митохондрий, однако оно также способствует контролю качества митохондрий, позволяя удалять поврежденные митохондрии [9]. В настоящем исследовании мы изучили влияние АСТ на изменение митохондриальной динамики в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью, инициированной ИЗО.

**Результаты.** Для исследования использовали четыре группы крыс линии Wistar (2-3 месяца, весом 220-250 гр.): 1 группа – контрольная, 2 группа – хроническое введение АСТ (150 мг/кг, в течении 14 суток),

3 группа – инъекция ИЗО (100 мг/кг дважды), 4 группа – хроническое введение АСТ и инъекция ИЗО. Митохондрии мозга крыс (ММК) выделяли по методике, описанной [10]. В таблице 1 представлены результаты по влиянию АСТ на изменение дыхательных активностей,  $\text{Ca}^{2+}$  ёмкости и митохондриального набухания в RBM. Параметры дыхательных активностей и  $\text{Ca}^{2+}$  ёмкости измеряли в термостатируемой ячейке, в которую вмонтированы  $\text{O}_2$  – Clark электрод и  $\text{Ca}^{2+}$ -селективный электрод [7]. Митохондрий инкубировали в 10 мМ Tris-HCl буфере pH 7.4, содержащем 120 мМ KCl, 0.4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 мМ глутамат и 5 мМ малат (дыхательные субстраты). Концентрация белка в ячейке была 1 мг/мл. Количественные характеристики дыхательной активности в состояниях 2, 3 и 4 определяли, как число атомов нг-О, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. ДК рассчитывался как отношение  $V_{\text{st.3}}$  к  $V_{\text{st.4}}$ . Митохондриальное набухание измеряли по изменению светорассеяния в митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм ( $A_{540}$ ) на спектрофотометре Tecan I-Control Infinite 200 при 25°C. Концентрация митохондриального белка в лунке составляла 0.5 мг белка/мл. Набухание инициировали добавлением 120 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$  на мг белка. Процесс набухания характеризовался временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ( $T_{1/2}$ ).

**Табл. 1.** Влияние АСТ на дыхательную активность,  $\text{Ca}^{2+}$  ёмкость и митохондриальное набухание в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточности. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (группа 1). # $p < 0.05$  по сравнению с RBM, изолированным от крыс, которым вводили ИЗО (группа 3).

	$V_{\text{st.2}}$	$V_{\text{st.3}}$	$V_{\text{st.4}}$	ДК	$\text{Ca}^{2+}$ ёмкость	$T_{1/2}$
контроль (1 гр.)	15.3 ± 3.8	99.5 ± 7.17	13.1 ± 5.6	7.5 ± 1.8	130 ± 13	325 ± 20
АСТ (2 гр.)	14.7 ± 4.6	96.6 ± 11.78	14 ± 4.2	6.8 ± 2.1	120 ± 16	450 ± 60
ИЗО (3 гр.)	10.9 ± 2.12*	73.1 ± 5.74*	17.5 ± 2.3*	4.1 ± 1.02*	80 ± 8.1*	150 ± 14*
АСТ + ИЗО (4 гр.)	14.5 ± 3.5#	104.3 ± 6.2#	13.7 ± 5.3#	8.5 ± 3.2#	125 ± 15#	375 ± 30#

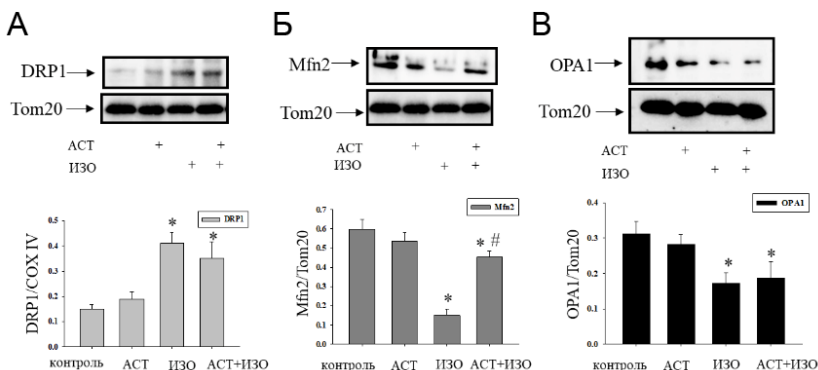
В таблице 1 показано, что скорость потребления  $\text{O}_2$  в состояниях 2 ( $V_{\text{st.2}}$ ) и 3 ( $V_{\text{st.3}}$ ) в ММК у крыс, которым вводили ИЗО, уменьшалась на 30 и 26.5% соответственно, по сравнению с ММК группы 1. После введения АСТ с последующей инъекцией ИЗО  $V_{\text{st.2}}$  и  $V_{\text{st.3}}$  в ММК увеличивались на 33% и 42%, соответственно, по сравнению с ММК, изолированными из группы с инъекцией ИЗО. АСТ не изменял  $V_{\text{st.4}}$ , тогда как ИЗО повышал  $V_{\text{st.4}}$  на 25% в ММК по сравнению с ММК из группы 1. Хроническое введение АСТ совместно с инъекцией ИЗО не изменяло  $V_{\text{st.4}}$  в ММК из группы 4 по сравнению с контролем и снижало на 22% по сравнению с

ММК, изолированными из группы 3. ДК в ММК крыс, которым вводили АСТ, и ММК у крыс, получавших АСТ с последующей инъекцией ИЗО не изменялся по сравнению с контролем. ДК в ММК из группы 3 снижался на 45% по сравнению с контролем. Хроническое введение АСТ в сочетании с ИЗО увеличивало ДК в два раза по сравнению с ДК в ММК из группы 3.

Далее мы проанализировали действие АСТ и ИЗО на ёмкость  $\text{Ca}^{2+}$  и изменение митохондриального набухания в наших экспериментальных условиях (табл. 1). Хроническое введение АСТ не изменяло ёмкость  $\text{Ca}^{2+}$  в ММК группы 2, в то время как инъекция ИЗО снижала этот параметр на 38% по сравнению с ММК контрольной группы. В условиях хронического введения АСТ с последующей инъекцией ИЗО ёмкость  $\text{Ca}^{2+}$  не изменялась по сравнению с ММК контрольной группы, но увеличивалась в два раза по сравнению с ММК, изолированными из крыс после ИЗО инъекции (3 группа), тем самым АСТ снимал эффект ИЗО.

При разобщении окислительного фосфорилирования наблюдается изменение проницаемости митохондриальной мембраны. Поэтому на следующем этапе нашего исследования мы проанализировали изменение набухания митохондрий в наших экспериментальных условиях. Введение АСТ приводило к повышению полупериода набухания  $T_{1/2}$  (характеризует время достижения полумаксимальной амплитуды набухания) на 38%, что говорит о том, что скорость набухания замедлялась по сравнению с контролем. Напротив, инъекция ИЗО повышала  $T_{1/2}$  на 54% по сравнению с контролем, при этом скорость набухания митохондрий увеличивалась. Введение АСТ крысам с последующей инъекцией ИЗО не изменяло скорость набухания по сравнению с контрольной группой (1 группа), но снижало  $T_{1/2}$  в ММК в 2 раза по сравнению с набуханием ММК у крыс после ИЗО инъекции (3 группы крыс). АСТ отменял индукторный эффект ИЗО и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное набухание митохондрий замедлялось.

Митохондрии млекопитающих образуют высокодинамическую ретикулярную сеть, в которой постоянно происходят события слияния и деления, при этом относительная степень этих двух событий влияет на контроль качества митохондрий. Слияние (fusion) опосредуется митофузинами 1 и 2 (Mfn1, Mfn2) и атрофией зрительного нерва 1 (OPA1), которые играют роль в слиянии внешней и внутренней мембран митохондрий соответственно. Родственный динамину белок 1 (DRP1) необходим для деления (fission) и регулируется посредством фосфорилирования с помощью PKA и Cdk1/циклина B [11,12]. Поэтому мы исследовали изменение содержания белков, участвующих в делении (DRP1) и слиянии (Mfn2, OPA1) и митохондрий в наших экспериментальных условиях (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние АСТ и ИЗО на изменение содержания белков, участвующих в слиянии и делении митохондрий. А (верхняя часть) – иммуноокрашивание антителами к DRP1; Б (верхняя часть) – иммуноокрашивание антителами к Mfn2; В (верхняя часть) – иммуноокрашивание антителами к OPA1. COX IV и Tom20 использовали как контроль белковой нагрузки. В нижней части А-В приведены количественные характеристики, отражающие соотношения оптической плотности белков к COX IV или Tom20, посчитанные с помощью компьютерной денситометрии. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD четырех независимых экспериментов. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (ММК 1 группы крыс), # $p < 0.05$  по сравнению с ММК после ИЗО инъекции (3 группа).

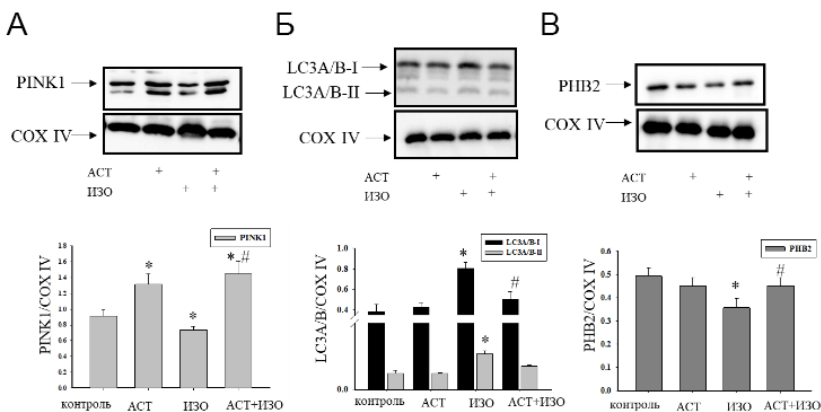
Как видно из рисунка, что ИЗО повышал содержание DRP1 в 2.7 раз в ММК по сравнению с контролем, тогда как при совместном действии АСТ и ИЗО, уровень DRP1 повышался в два раза по сравнению с контролем (рис. 2А). Уровни Mfn2 (рис. 2Б) и OPA1 (рис. 2В) снижались при действии ИЗО в 4 раза и на 45% соответственно по сравнению с контролем. АСТ отменял эффект ИЗО, при этом содержание Mfn2 повышалось в 4 раза по сравнению с действием ИЗО, но экспрессия OPA1 в этих условиях не изменялась.

Слияние (fusion) способствует смешению митохондрий и обеспечивает целостность и однородность митохондриальной сети, защищает от потери митохондриальной ДНК (мтДНК) и поддерживает оптимальную биоэнергетическую активность. С другой стороны, деление (fission) способствует распространению и наследованию митохондрий и помогает в изоляции дисфункциональных (поврежденных) митохондрий из интактной сети и их избирательном удалении с помощью митофагии [13].

Митофагия относится к процессу селективного удаления клетками избыточных или поврежденных митохондрий посредством аутофагии, что играет важную роль в «контроле качества» митохондрий и выживании

клеток. У млекопитающих было охарактеризовано несколько рецепторов митофагии, одним из них является прохибитин 2 (РНВ2) – белок, который имеет решающее значение в ориентировании митохондрий на аутофагическую деградацию [14].

В настоящем исследовании мы проанализировали влияние АСТ на изменение маркеров митофагии PINK1, аутофагии LC3A/B (I, II) и РНВ2 в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью. АСТ повышал содержание PINK1 (рис. 3А) на 40%, в то время как ИЗО снижал на 20% по сравнению с контролем. При совместном действии АСТ и ИЗО, содержание PINK1 повышалось на 40% по сравнению с контролем и в 2 раза по сравнению с одним ИЗО. ИЗО повышал содержание LC3A/B (I) и LC3A/B (II) на 2 раза по сравнению с контролем (рис. 3Б). При совместном действии АСТ и ИЗО, уровни LC3A/B (I) и LC3A/B (II) снижались на 40 и 35% соответственно по сравнению с действием ИЗО. Содержание РНВ2 уменьшалось на 30% по сравнению с контролем при действии ИЗО, тогда как при хроническом введении АСТ с последующей инъекцией ИЗО, уровень РНВ2 повышался на 26% по сравнению с одним ИЗО (рис. 3В).



**Рис. 3.** Влияние АСТ и ИЗО на изменение содержания PINK1, LC3A/B (I, II) и РНВ2. А – иммуноокрашивание антителами к PINK1; Б (верхняя часть) – иммуноокрашивание антителами к LC3A/B; В (верхняя часть) – иммуноокрашивание антителами к РНВ2. COX IV использовали как контроль белковой нагрузки. В нижней части А-В приведены количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности белков к COX IV, посчитанные с помощью компьютерной денситометрии. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD четырех независимых экспериментов. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (ММК 1 группы крыс), # $p < 0.05$  по сравнению с ММК после ИЗО инъекции (3 группа).

**Заключение.** В настоящем исследовании мы изучили влияние АСТ на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной ИЗО и проанализировали изменение митохондриальной динамики в этих условиях. ИЗО снижал дыхательный контроль в ММК, в то время как АСТ его восстанавливал. Снижение  $\text{Ca}^{2+}$  ёмкости митохондрий и увеличение скорости митохондриального набухания говорят об ухудшении проницаемости митохондриальной мембраны в присутствии ИЗО, тогда как хроническое введение АСТ улучшало эти параметры, несмотря на инъекцию ИЗО. Известно, что деление и слияние митохондрий могут служить важными механизмами контроля качества для сохранения митохондрий. Здоровые митохондрии являются основой производства энергии. В целом митохондрии поддерживают гомеостаз за счет постоянного деления, слияния и митохондриальной аутофагии, которые имеют решающее значение для поддержания качества и количества митохондрий. Считается, что повреждения, вызывающие потерю или деградацию белков, контролирующих слияние (fusion) митохондрий, скорее всего, вызовут деление (fission) митохондрий и митофагию [15]. Однако в наших условиях мы наблюдали, что ИЗО, вызывающий ухудшение функционального состояния митохондрий снижал содержание Mfn2 и OPA1 (fusion), повышал DRP1 (fission), однако митофагия не усиливалась, PINK1 снижался, хотя LC3A/B (I, II) повышался. Снижение экспрессии PNB2 ингибирует митофагию [15]. В наших условиях ИЗО снижал содержание PNB2, ингибируя PINK1, что возможно привело к накоплению поврежденных митохондрий. В ММК, изолированных из крыс, получавших АСТ с последующей инъекцией ИЗО, содержание PNB2 повышалось, митофагия усиливалась (экспрессия PINK1 повышалась). Хроническое введение АСТ, улучшая функциональное состояние митохондрий приводит к возможному регулированию процессов слияния и деления, восстанавливая целостность митохондриальной сети.

Работа выполнена в рамках Госзадания Института Теоретической и Экспериментальной биофизики РАН № 075-01025-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Rezin G.T., Amboni G., Zugno A.I. et al. // Neurochem. Res. 2009. 34 (6): 1021-9.*
2. *Bhatti J.S., Bhatti G.K., Reddy P.H. // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 2017. 1863(5): 1066-77.*
3. *Halliwel B. // Biochem. Soc. Symp. 1995. 61: 73-101.*
4. *Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2006. 46(2): 185-96.*
5. *Kim S.H., Kim H. // Nutrients. 2018. 10(9): 1137.*
6. *Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I. et al. // Antioxidants (Basel). 2019. 8(12): 576.*



7. Krestinin R., Baburina Y., Odinokova I. et al. // Biomedicines. 2020. 8(10): 437.
8. Krestinina O., Baburina Y., Krestinin R. et al. // Antioxidants (Basel). 2020. 9(3): 262.
9. Zhao X.-Y., Lu M.-H., Yuan D.-J. // Front. Neurosci. 2019. 13: 30.
10. Baburina Y., Krestinin R., Fedorov D. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. 24(1): 31.
11. Twig G., Shirihai O.S. // Antioxid. Redox Signal. 2011. 14: 1939-51.
12. Cribbs J.T., Strack S. // EMBO Rep. 2007. 8: 939-44.
13. Escobar-Henriques M., Anton F. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. 1833: 162-75.
14. Wei Y., Chiang W.C., Sumpter R.Jr. et al. // Cell. 2017. 168: 224-38.
15. Li W., He P., Huang Y et al. // Theranostics. 2021. 11(1): 222-56.

## ВСПЫШКИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ ПРИ СТРЕССЕ В ФИБРОБЛАСТАХ С МУТАЦИЕЙ, СВЯЗАННОЙ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

*Крицкая К.А.<sup>1</sup>, Федотова Е.И.<sup>1,2</sup>, Ларюшкин Д.П.<sup>1</sup>, Бережнов А.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное  
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>Орловский государственный университет, Орел, Россия

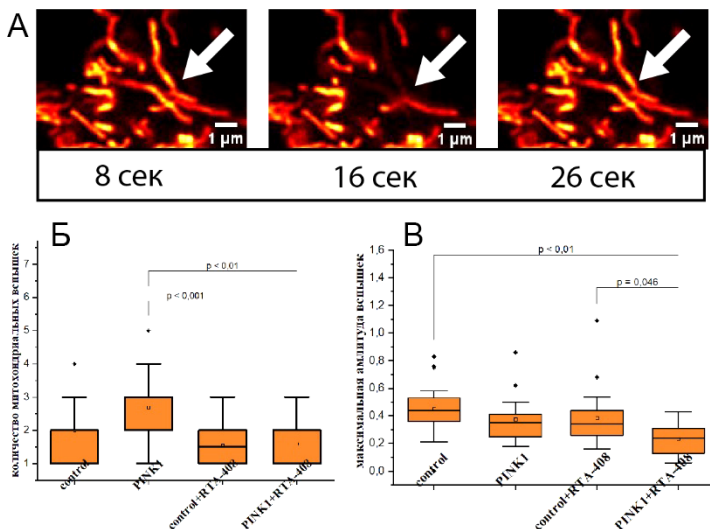
**Введение.** Митохондриальная вспышка (mitoflash) – это резкое изменение потенциала мембраны митохондрий длительностью около 10 секунд, характерное для митохондрий различных типов клеток. Митохондриальная вспышка в одиночной митохондрии или митохондриальной сети коррелирует по времени с такими процессами, как всплеск выработки супероксида, резкое защелачивание матрикса митохондрии, обратимое окисление NADH и FADH<sub>2</sub>. В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что митохондриальные вспышки являются элементарными сигнальными событиями, участвующими в жизненно важных физиологических функциях, начиная от метаболизма и регулирования судьбы клеток и заканчивая реакциями на стресс [1-2]. Так, при стрессовом воздействии на клетку (увеличение АФК продукции, перегрузка Ca<sup>2+</sup>, гиперосмотический стресс и т.д.) количество митохондриальных вспышек увеличивается. Предполагают, что возникновение митохондриальных вспышек контролируется временным открытием переходной поры митохондриальной проницаемости (mPTP) и может участвовать при различных патологических процессах, в том числе, связанных с болезнью Паркинсона [3-4]. Целью нашей работы было изучить количество и амплитуду митохондриальных вспышек в фибробластах с мутацией PINK1 (homozygous p.Try90Leufsx12), связанной с развитием наследственной формы болезни Паркинсона в условиях стресса (добавка

пероксида водорода), а также оценить влияние предварительной добавки активатора фактора транскрипции Nrf2 RTA-408 (омавелоксолон) [5] на эти параметры у исследуемых клеток.

**Материалы и методы.** Фибробласты были посеяны на круглые покровные стекла. Перед экспериментом культуры помещали в измерительную ячейку для инвертированного микроскопа и загружали флуоресцентным зондом TMRM в концентрации 20 нМ, который оставался в среде. Далее проводили запись серий изображений флуоресценции с частотой 1 кадр в 8 сек в течение 5 мин при минимальной мощности лазера, которая в контрольных опытах не вызывала изменения средней флуоресценции TMRM во время записи, и при высокой мощности лазера (50% от максимального) для индукции митохондриальных вспышек на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном системой суперразрешения Airyscan 2. Условия стресса создавались при помощи предварительной добавки пероксида водорода в концентрации 100 мкМ в течение 1 ч, после чего происходила замена среды и клетки оставляли в покое еще на 1 ч. Для исследования действия активатора Nrf2 RTA-408, данное вещество добавляли исследуемым клеткам на 24 ч до начала эксперимента в концентрации 50 нМ. Подсчет количества и амплитуды митохондриальных вспышек происходил в ручном режиме в программе Fiji. Митохондриальной вспышкой считалось такое событие, которое приводило к резкой и обратимой потере флуоресценции TMRM отдельной митохондрией или группой митохондрий (рис. 1А).

**Результаты.** Количество митохондриальных вспышек (рис. 1Б) при воздействии пероксида водорода и высокой мощности лазера значимо не отличались в контрольных фибробластах и в фибробластах с мутацией PINK1 ( $n = 10$ ), однако в фибробластах с мутацией PINK1 наблюдалась тенденция в сторону увеличения этого значения. При предварительной добавке RTA-408 на 24 ч (рис. 1Б), в фибробластах с мутацией PINK1 происходило значимое снижение количества митохондриальных вспышек, что, возможно, может объясняться активацией защитных антиоксидантных путей клетки, опосредуемых фактором транскрипции Nrf2, и изменением митохондриальной функции. Амплитуда митохондриальных вспышек (рис. 1В) значимо не различалась у контрольных фибробластов и в фибробластах с мутацией PINK1 ( $n = 10$ ) при воздействии пероксида водорода и высокой мощности лазера, но при добавлении RTA-408 на 24 ч в тех же условиях амплитуда у контрольных клеток становилась выше, что может объясняться более высоким митохондриальным потенциалом. Таким образом, в данной работе был проведен анализ митохондриальных вспышек в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией, связанной с нарушением функций митохондрий и развитием болезни Паркинсона в условиях

стресса. Помимо этого, установлено влияние RTA-408 – активатора фактора транскрипции Nrf2, регулирующего антиоксидантную защиту клетки.



**Рис. 1.** Количество и амплитуда митохондриальных вспышек в исследуемых клетках. А. Пример «митохондриальной вспышки» в контрольных фибробластах. Количество митохондриальных вспышек (Б), амплитуда митохондриальных вспышек (В), измеренные в контрольных фибробластах и фибробластах с мутацией PINK1, после воздействия пероксида водорода в концентрации 100 мкМ на 1 ч, а также при предварительной добавке активатора Nrf2 RTA-408 в концентрации 50 нМ на 24 ч и пероксида водорода в концентрации 100 мкМ на 1 ч.

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-01512-22-03 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4. с использованием оборудования ЦКП ПНЦБИ РАН, в частности УНУ № 445679.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Feng G., Liu B., Hou T., et al. // Handb. Exp. Pharmacol. 2017. 240: 403-22.
2. Breckwoldt M.O., Pfister F.M., Bradley P.M., et al. // Nat. Med. 2014. 20: 555-603.
3. Li W., Sun T., Liu B. et al. // Sci. Rep. 2016. 6: 32933.
4. Wang J.Q., Chen Q., Wang X. et al. // Biol. Chem. 2013. 288(5): 3070-84.
5. Dinkova-Kostova A.T., Copple I.M. // Trends Pharmacol. Sci. 2023. 44(3): 137-49.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ GLN263LEU В СУБЪЕДИНИЦЕ БЕТА  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АТФ-СИНТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ НА СКОРОСТЬ  
ГИДРОЛИЗА НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АТФ  
В ПРИСУТСТВИИ АДФ

Лапашина А.С.<sup>1,2</sup>, Галкина К.В.<sup>1</sup>, Маркова О.В.<sup>1</sup>,  
Кнорре Д.А.<sup>1</sup>, Фенюк Б.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени  
М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Митохондриальная АТФ-синтаза является одним из ключевых ферментов биоэнергетики эукариотической клетки. Фермент осуществляет сопряженный с трансмембранным протонным транспортом синтез АТФ за счет протондвижущей силы (pmf), генерируемой ферментами дыхательной цепи [1]. В условиях, когда активность дыхательной цепи падает (например, в условиях аноксии), pmf снижается, и АТФ-синтаза начинает работать в обратную сторону и создает pmf за счет гидролиза АТФ.

АТФ-синтаза составляет значительную (10% и более) долю общего белка внутренней мембраны митохондрий. Учитывая высокую скорость работы фермента (сотни АТФ за секунду на 1 молекулу АТФ-синтазы), при падении или исчезновении pmf можно было бы ожидать быстрого снижения концентрации АТФ в матриксе. Однако ряд регуляторных механизмов подавляет АТФазную активность фермента в отсутствие pmf. Наиболее широко распространенный и, вероятно, древний из них – это так называемое АДФ-ингибирование [2]. Если при гидролизе АТФ в каталитическом сайте оказывается АДФ в отсутствие фосфата, это может привести к переходу фермента в неактивное состояние с «запертым» в каталитическом сайте АДФ. Спонтанная реактивация фермента в условиях де-энергизованной мембраны происходит достаточно медленно (в минутной шкале), но резко ускоряется с повышением pmf.

Ранее мы установили, что точечная мутация Gln263Leu в каталитической субъединице бета АТФ-синтазы митохондрий пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ослабляет АДФ-ингибирование [3]. Скорость гидролиза 1 мМ АТФ митохондриями и субмитохондриальными вывернутыми частицами (СМЧ) из мутантного штамма почти не падала в ответ на добавку АДФ до концентрации 1 мМ, в то время как на образцах из штамма дикого типа в этих условиях наблюдалось почти двукратное снижение АТФазной активности. Однако особый интерес представляет роль АДФ-ингибирования при низких концентрациях АТФ, т.к. из

теоретических соображений можно предположить, что именно в таких условиях этот регуляторный механизм должен быть особенно выражен: пока АТФ присутствует в матриксе в миллимолярных концентрациях, ингибирование АТФазной активности АТФ-синтазы может быть не столь жизненно важным.

Чтобы проверить влияние АДФ-ингибирования на АТФазную активность фермента при низких концентрациях АТФ, мы использовали люциферин-люциферазную систему, позволяющую в реальном времени количественно измерять концентрацию АТФ в микромолярном диапазоне.

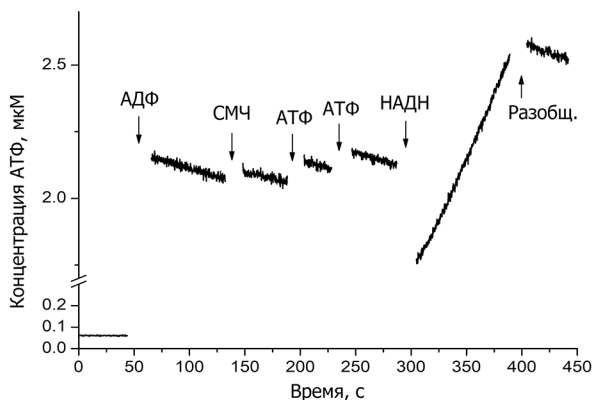
**Материалы и методы.** Введение в геном пекарских дрожжей *S. cerevisiae* мутации Gln263Leu в каталитической субъединице бета АТФ-синтазы митохондрий, процедуры выращивания дрожжей, выделения и очистки митохондрий и субмитохондриальных частиц описаны в работе [3].

Измерение синтеза АТФ и последующего его гидролиза СМЧ дрожжей проводилось с помощью люциферин-люциферазной реакции (набор АТР Bioluminescence CLS II, Roche). Сигнал люминесценции регистрировали на флуориметре Horiba Jobin Yvon Fluoromax-3 с выключенным возбуждением и длиной волны измерения 560 нм. Среда измерения содержала 20 мМ HEPES, 0,65 мМ сорбита, 17 мМ ацетата калия, 3 мМ  $K_2HPO_4$ , 100 мМ АДФ, 1 мМ ацетата магния, 2 мМ Р1,Р5-ди(аденозин-5')пентафосфата (Ар5А, ингибитор аденилаткиназы); значение рН составляло 7,8. Сигнал люминесценции калибровали тремя последовательными добавками АТФ (каждая увеличивала концентрацию на 100 нмоль). Реакцию синтеза запускали добавлением НАДН до 1 мМ. Реакцию гидролиза запускали добавлением разобщителя-протонофора (смесь валиномицина и нигерицина, конечная концентрация того и другого в образце – 500 нМ). Для специфического ингибирования АТФ-синтазы митохондрий использовался вентурицидин, блокирующий протон-транслоцирующий домен фермента. Измерения проводились при комнатной температуре; для каждого образца проводилось 3 повтора измерений.

**Результаты.** На рис. 1 представлены результаты одного из серии измерений синтеза и гидролиза АТФ субмитохондриальными частицами, полученными из пекарских дрожжей дикого типа и из штамма с мутацией Gln263Leu в каталитической субъединице бета АТФ-синтазы.

Используемый метод позволяет легко и точно определять концентрацию АТФ в образце в пределах от наномолярных до микромолярных концентраций. На рис. 1 видно, что добавка АДФ до 100 мкМ также привела к скачку концентрации АТФ до 2.2 мкМ, что обусловлено наличием примеси ~2% АТФ в использованном АДФ. Увеличение концентрации АТФ также привело к значительному увеличению шума измеряемого сигнала. После появления в среде АТФ

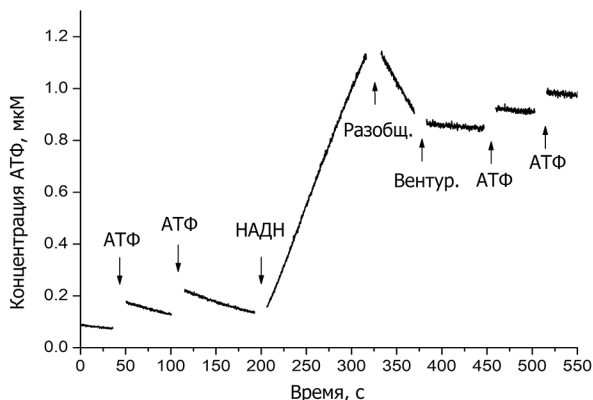
наблюдался дрейф сигнала, причины которого до конца не ясны; его скорость составляла 0.9 нМ/с. Добавка СМЧ дикого типа, а также калибровочные добавки АТФ не оказывали влияния на его скорость. Эти данные говорят, что в условиях, когда в среде присутствует лишь 2.2 мкМ АТФ на фоне 100 мкМ АДФ, скорость гидролиза АТФ митохондриальной АТФ-синтазой дикого типа ничтожно мала. Добавка субстрата дыхательной цепи НАДН вызвала рост концентрации АТФ в образце; скорость роста составила 9.3 нМ/с, что в пересчете на белок составляло 0.11 ммоль АТФ/мг белка за минуту. Последующая добавка разобщителя, вызывающая исчезновение *pmf* на мембране, привела к остановке роста концентрации АТФ и возобновлению ее спада (скорость 1.8 нМ/с).



**Рис. 1.** Синтез и гидролиз АТФ субмитохондриальными частицами дрожжей дикого типа. Условия измерения описаны в Материалах и методах. Добавки: АДФ до 100 мкМ; СМЧ до 6 мкг/мл (указана концентрация тотального белка), АТФ до 100 мкМ, НАДН до 1 мМ, разобщители (валиномицин+нигерицин, до 500 нМ каждый). Ось y нарисована с разрывом.

Полученные результаты говорят, что даже после появления на мембране *pmf* и активного синтеза АТФ, после де-энергизации гидролиз АТФ субмитохондриальными частицами дрожжей дикого типа также не обнаруживается.

Иная картина наблюдалась на СМЧ, выделенных из мутантного штамма с ослабленным АДФ-ингибированием. В этих образцах после добавки АДФ до 100 мкМ также наблюдался скачок концентрации АТФ до ~2 мкМ, однако затем начинался ее быстрый спад, и за несколько минут концентрация АТФ падала до суб-микромольных значений. На рис. 2 приведены результаты измерения в образце СМЧ из штамма дрожжей с мутацией *Gln263Leu* в каталитической субъединице бета АТФ-синтазы митохондрий после того, как концентрация АТФ упала до ~100 нМ.



**Рис. 2.** Синтез и гидролиз АТФ субмитохондриальными частицами дрожжей мутантного штамма с ослабленным АДФ-ингибированием. Условия измерения описаны в Материалах и методах. АДФ добавлен за 7 мин до начала измерения, при этом уровень АТФ вырос до 2.2 мкМ. После добавки СМЧ до 11 мкг/мл (указана концентрация тотального белка) концентрация АТФ непрерывно снижалась (не показано). Добавки: АТФ до 100 нМ, НАДН до 1 мМ, разобщители (валиномицин+нигерицин, до 500 нМ каждый), вентурицидин до 1 мкМ, АТФ до 100 нМ.

Видно, что после калибровочных добавок АТФ скорость падения концентрации АТФ несколько возросла. Синтез АТФ после добавки НАДН шел со скоростью, сравнимой с таковой на образце из дрожжей дикого типа (8.6 нМ/с, соответствует ~0.07 ммоль АТФ/мг белка за минуту). Добавка разобщителя привела к остановке синтеза АТФ и быстрому снижению его концентрации (скорость 5.1 нМ/с), однако после добавки ингибитора протон-транслоцирующей мембранной части АТФ синтазы падение концентрации АТФ практически прекратилось.

Эти результаты говорят, что в отличие от АТФ-синтазы дикого типа, фермент с мутацией Gln263Leu способен с большой скоростью гидролизовать АТФ даже в условиях, когда концентрация последнего составляет лишь 2 мкМ на фоне 100 мкМ АДФ. При этом АТФазная активность мутантного фермента сопряжена с протонным транспортом, т.к. вентурицидин, блокирующий этот транспорт, также приводил к практически полной остановке гидролиза.

**Заключение.** В данной работе показано, что мутация Gln263Leu в каталитической субъединице бета АТФ-синтазы митохондрий *S. cerevisiae* резко (более чем на порядок) увеличивает АТФазную активность фермента в условиях микромолярных количеств АТФ на фоне 50-кратного

избытка АДФ. Ранее было показано, что данная мутация ослабляет АДФ-ингибирование фермента. Можно предположить, что низкая АТФазная активность фермента дикого типа связана именно с выраженным АДФ-ингибированием, физиологическая роль которого заключается в эффективном (практически полном) «выключении» АТФ-синтазы в условиях де-энергизации, когда одновременно и pmf и концентрация АТФ падают, а концентрация АДФ возрастает.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zubareva V.M. et al. // *Biochemistry*. 2020. 85(12): 1613-30.
2. Lapashina A.S., Feniouk B.A. // *Biochemistry*. 2018. 83(10): 1141-60.
3. Lapashina A.S. et al. // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2022. 1863(5): 148544.

## НАБЛЮДЕНИЯ ЗА УРОВНЕМ АТФ В МИТОХОНДРИЯХ И ЦЕЛЫХ КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

*Лапашина А.С.<sup>1,2</sup>, Галкина К.В.<sup>1,2</sup>, Маркова О.В.<sup>2</sup>,  
Кнорре Д.А.<sup>1,2</sup>, Фенюк Б.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** С момента своего появления в середине XX века биоэнергетика была сосредоточена на изолированных системах. Эксперименты на очищенных ферментах и их субкомплексах, а также искусственных или выделенных из клеток мембранных структурах позволили понять основные принципы клеточной энергетике – однако *in vivo* ряд важных биоэнергетических параметров до сих пор не оценен. Одним из таких параметров является концентрация АТФ в матриксе митохондрий: разделить пулы митохондриального и цитоплазматического АТФ в эксперименте очень сложно. Вместе с тем, концентрация АТФ в матриксе оказывает прямое влияние на активность митохондриальных ферментов. Одним из подходов, позволяющих оценивать концентрацию АТФ в митохондриях, является экспрессия в клетках митохондриально-направленной люциферазы. Этот фермент АТФ-зависимо окисляет специфический субстрат, люциферин, в результате чего испускается свет,

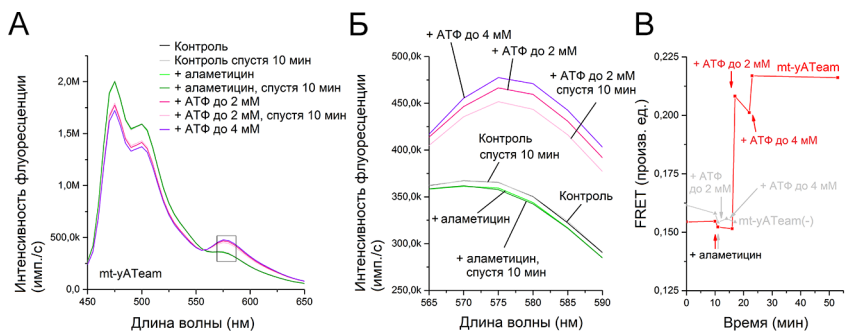


который можно измерять на люцинометре. Однако этот подход требует доставки люциферина в митохондрии и позволяет лишь полуколичественные измерения, т.е. определение относительных изменений уровня АТФ [1]. Альтернативой являются АТФ-связывающие флуоресцентные белковые зонды. В этой работе мы использовали зонды семейства АTeam – химеры, в которых небольшой АТФ-связывающий белок фланкирован двумя флуоресцентными белками. При связывании АТФ с зондом флуоресцентные белки сближаются, и происходит Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) между ними, который можно детектировать по изменению формы флуоресцентного спектра испускания. Первые зонды АTeam предназначались для экспрессии в клетках млекопитающих [2], затем появился вариант уАTeam, оптимизированный для пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Целью этой работы было направить зонд уАTeam в митохондрии дрожжей, разработать способ количественного определения уровня АТФ на основе сигнала зонда в изолированных митохондриях, а также показать возможность применения нового метода для наблюдения за уровнем АТФ в живых дрожжах.

**Материалы и методы.** В работе использовались плазмиды pDRF1-GW-уАТ1.03 (кодирует АТФ-чувствительный уАTeam) и pDRF1-GW-уАТ1.03 R122KR126K (кодирует аналогичный зонд с мутациями, неспособный связывать АТФ) [3]. В эти конструкции к N-концу гена зонда мы добавили последовательность сигнала митохондриальной локализации дрожжей. Зонды с митохондриальной локализацией получили название mt-уАTeam. Для трансформации использовали штамм *S. cerevisiae* W303. Локализация зонда в клетках была показана с помощью флуоресцентной микроскопии. Изолированные митохондрии получали по методике [4]. Для измерений флуоресценции митохондрий и целых клеток использовали кюветный флуориметр Horiba Jobin Yvon FluoroMax-3. Измеряли спектры испускания; возбуждение происходило при 430 нм. Для оценки концентрации АТФ измеряли уровень FRET, который рассчитывали как интенсивность испускания при 575 нм (пик спектра, соответствующий белку-акцептору), поделенная на сумму интенсивностей при 475 и 575 нм (сумма пиков флуоресценции донорного и акцепторного белков).

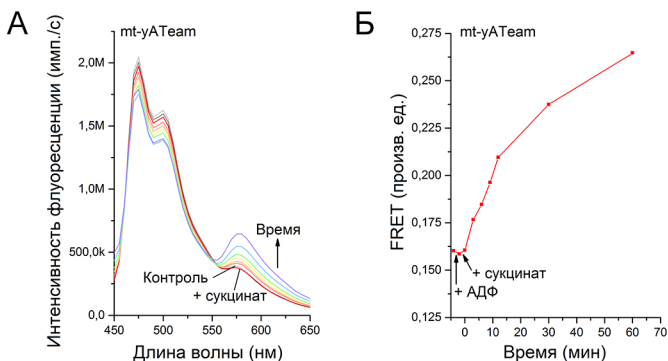
**Результаты.** Первая серия экспериментов проводилась на изолированных митохондриях, пермеабилizованных аламетицином. В этом случае mt-уАTeam неспособен покинуть митохондриальный матрикс, а концентрация небольших молекул, таких как АТФ и АДФ, уравнивается между матриксом и окружающей средой. В случае митохондрий с mt-уАTeam, но не с контрольным зондом mt-уАTeam(-), добавление АТФ в кювету до 2 мМ приводило к изменению спектра

флуоресценции (рис. 1). Таким образом, ответ зонда *mt-yATeam* на качественном уровне позволяет судить об изменении концентрации АТФ в матриксе. При дальнейшем повышении концентрации АТФ в кювете (до 4 мМ) уровень FRET менялся мало; возможно, причиной тому является насыщение зонда АТФ. Стоит отметить, что при добавлении аламетицина в начале эксперимента можно было бы ожидать падения FRET, поскольку в присутствии аламетицина концентрация АТФ в матриксе митохондрий и в среде измерения выравнивается, т.е. внутримитохондриальный АТФ «разбавляется». Этого, однако, не наблюдалось. Вероятно, в ходе выделения митохондрий концентрация АТФ в матриксе падает ниже величины предела детекции зонда, который имеет порядок величины сотен мкМ [3].



**Рис. 1.** Флуоресцентные спектры испускания митохондрий дрожжей с АТФ-зависимым зондом *mt-yATeam* и контрольным не связывающим АТФ зондом *mt-yATeam(-)*. Среда измерений содержала: 150 мМ КСl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ калий-фосфатного буфера и 20 мМ НЕРЕС (рН 7.5). На панели Б представлен увеличенный фрагмент графика А, выделенный прямоугольной рамкой. В – значения FRET, рассчитанные из спектров *mt-yATeam* (А) и *mt-yATeam(-)* (спектры не показаны). Аламетицин добавляли до 10 мкг/мл.

В следующей серии экспериментов была измерена скорость синтеза АТФ в интактных изолированных митохондриях. Для этого в кювету, содержащую митохондрии с зондом *mt-yATeam*, добавляли АДФ, фосфат и сукцинат. Мы предполагали, что за счет окисления сукцината ферментами дыхательной цепи будет происходить синтез АТФ из АДФ и фосфата путем окислительного фосфорилирования. В соответствии с нашими ожиданиями, после добавки АДФ и сукцината наблюдался рост уровня FRET (рис. 2). Насколько мы можем судить, этот результат представляет собой первое экспериментальное наблюдение за синтезом АТФ внутри интактных митохондрий.

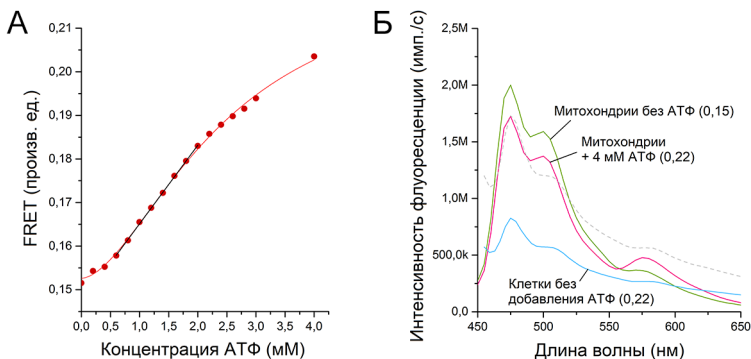


**Рис. 2.** Слева: флуоресцентные спектры испускания митохондрий дрожжей с АТФ-зависимым зондом mt-yATeam при добавлении АДФ и сукцината натрия. Спектры снимали в тех же условиях, что и на рис. 1. АДФ добавляли до 0.5 мМ. Справа: уровни FRET, рассчитанные из приведенных слева спектров. Сукцинат натрия добавляли до 4 мМ.

Наконец, мы провели прямую количественную калибровку зонда, постепенно добавляя АТФ к пермеабелизованным митохондриям с зондом mt-yATeam (рис. 3). С каждой добавкой концентрация АТФ в кювете (и в матриксе митохондрий) повышалась на 200 мкМ. Зависимость FRET от концентрации АТФ хорошо аппроксимировалась функцией Хилла; в диапазоне АТФ от 600 мкМ до 2 мМ эта зависимость была близка к линейной. Важно отметить, что такая калибровка может быть неточной: в присутствии аламетицина протонный градиент на внутренней мембране митохондрий рассеивается, и  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза начинает гидролизовать АТФ. Эта АТФазная активность может быть достаточно большой, чтобы гидролизовать часть добавленного в кювету АТФ по мере снятия спектров. Ее количественный вклад сложно оценить, поскольку ее величина зависит от концентрации АТФ и меняется с течением эксперимента. Несмотря на эти оговорки, полученные нами данные позволяют приблизительно оценить скорость синтеза АТФ в интактных митохондриях в описанном выше эксперименте (рис. 2) – около 200 мкМ/мин; удельная активность, рассчитанная с учетом концентрации тотального белка в митохондриях – около 1.5 мМ/мин на мг белка.

Помимо работы на изолированных митохондриях, мы измерили спектры флуоресценции целых клеток дрожжей, содержащих зонд mt-yATeam. В этих экспериментах клетки дрожжей растили в среде YNB без урацила до достижения экспоненциальной фазы роста, переносили во флуориметрические кюветы со средой, содержащей 1.2 М сорбитола и 10 мМ HEPES (pH = 7.5), и регистрировали флуоресцентный сигнал. Стоит отметить, что интенсивность флуоресцентного сигнала целых клеток оказалась заметно ниже, чем изолированных митохондрий, а также был замечен неспецифический вклад рассеяния (рис. 3Б). Для оценки

концентрации АТФ в митохондриях целых клеток мы воспользовались калибровочной кривой, полученной для зонда mt-yAteam в матриксе изолированных митохондрий. Рассчитанная таким образом концентрация АТФ составляла от 4 до 5 мМ; уровень FRET в этих экспериментах лежал в пределах 0.20-0.22. На данный момент это единственное прямое измерение внутримитохондриального АТФ в интактных клетках дрожжей, о котором нам известно.



**Рис. 3.** А – зависимость флуоресцентного сигнала зонда mt-yAteam в пермеабелизованных аламетицином митохондриях дрожжей от концентрации АТФ, добавляемого к среде измерения. После каждой добавки концентрация АТФ в кювете увеличивалась на 200 мкМ. Каждая точка соответствует спектру, снятому после добавления АТФ в кювету. Черная линия – линейная аппроксимация фрагмента кривой от 600 мкМ до 2 мМ АТФ; тонкая красная линия – аппроксимация всех данных кривой Хилла. Б – флуоресцентные спектры изолированных митохондрий и целых клеток дрожжей, содержащих зонд mt-yAteam. Пунктирная линия представляет собой спектр флуоресценции клеток, нормированный на высоту левого пика спектра митохондрий после добавки АТФ. Регистрация всех спектров и расчет FRET-сигнала производились так же, как указано в подписи к рис. 1.

**Заключение.** В ходе работы был разработан подход, позволяющий при помощи флуоресцентного белкового зонда наблюдать за уровнем АТФ в матриксе митохондрий дрожжей: как в изолированных митохондриях, так и в целых клетках. Прямая калибровка ответа зонда позволила впервые измерить скорость синтеза АТФ интактными изолированными митохондриями, а также оценить концентрацию АТФ внутри митохондрий в целых клетках дрожжей в экспоненциальной фазе роста на богатой среде. Использование митохондриально-направленных зондов в сочетании с зондами, локализованными в цитоплазме, позволит по отдельности оценивать динамику концентрации АТФ в митохондриях и цитоплазме дрожжей *in vivo* при различных воздействиях на клетки.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268)

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Morciano G., Imamura H., Patergnani S. et al. // Methods Cell Biol.* 2020. 155: 199-219.
2. *Imamura H., Huynh Nhat K.P., Togawa H. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. 106(37): 15651-6.
3. *Botman D., van Heerden J.H., Teusink B. // ACS Sens.* 2020. 5(3): 814-22.
4. *Bazhenova E.N., Deryabina Y.I., Eriksson O., Zvyagilskaya R.A., Saris N.E. // J. Biol. Chem.* 1998. 273: 4372-7.

### ИНТРАНАЗАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ, СНИЖАЮЩАЯ ПОТЕРЮ НЕЙРОНОВ, КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

*Миронова Г.Д.<sup>1</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1</sup>, Жданова Д.Ю.<sup>2</sup>, Бобкова Н.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук –  
обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский  
центр «Пушинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук», Пушино, Россия

Известно, что многие заболевания, включая неврологические и сердечно-сосудистые, а также старение организма, сопровождаются дисфункцией митохондрий в клетках, которая плохо поддается лечению. В последние десятилетие появились работы, в которых при операции на сердце в эксперименте стали использовать трансплантацию функционально активных митохондрий путём их прямой инъекции в поражённый участок миокарда. В этих работах были использованы митохондрии, выделенные из мышечной ткани того же животного. В дальнейших исследованиях было показано, что защитный эффект наблюдается также при использовании митохондрий, выделенных из ткани печени и сердца. То есть митохондрии не обладают ткане- и видо-специфичностью. Было обнаружено, что прижизненно маркированные митохондрии попадают в кардиомиоциты и остаются функциональными и жизнеспособными. При этом наблюдалось улучшение постишемического функционального состояния сердца (ЭКГ и др.), увеличение общего содержания высокоэнергетических соединений в ткани, восстановление поврежденной митохондриальной ДНК. Установлено, что трансплантация митохондрий не вызывает аутоиммунный ответ и реакций их отторжения в организме.

Недавно появились работы по терапевтическому действию внутривенно введенных митохондрий. Было показано, что митохондрии при инкубации в сыворотке не теряли свою активность. На моделях болезней Паркинсона и Альцгеймера, введенные в кровь митохондрии восстанавливали ряд биохимических показателей, таких как активность дыхательных комплексов, содержание АТФ и восстановленного глутатиона, уровень продукции АФК и другие параметры, нарушенные у экспериментальных животных. При этом после проведенной терапии у животных с моделью болезни Паркинсона (БП) восстанавливалась двигательная активность в тесте принудительного плавания. На модели болезни Альцгеймера (БА) у животных, получавших лечение, наблюдалась меньшая потеря нейронов в гиппокампе и снижение интенсивности глиоза.

Однако, внутривенное введение митохондрий имеет, как известно, свои недостатки. В частности, этот метод предполагает необходимость использования высоких доз митохондрий, что может привести к их накоплению в легких и печени, вызвать воспалительные реакции или другие побочные эффекты, не говоря уже о возможности образования тромбов, а главное, что этот метод является довольно травматичным и инвазивным. Поэтому мы предложили вводить митохондрии неинвазивным интраназальным способом. Использование этого метода позволило нам осуществить таргетную доставку в мозг функционально активных митохондрий, и на модели спорадической формы БА доказать эффективность и перспективность этой процедуры для лечения данного заболевания, на что получен соответствующий патент [1,2]. В последние два года в трёх лабораториях мира были получены данные, подтверждающие открытую нами возможность использования интраназального введения митохондрий для восстановления памяти, нарушенной при различных экспериментальных патологиях [2-6].

В работах по интраназальному введению митохондрий было показано, что эта простая манипуляция обращает вспять когнитивные нарушения, наблюдаемые при химиотерапии, болезнях Паркинсона и Альцгеймера и даже инсульте. Обнаружено, что она снижает дефицит белого вещества, дефекты синапсомембранных мембран и потерю нейронов. Предполагается, что доставка митохондрий, как и других микрочастиц из носовой полости в мозг, осуществляется путем внутриклеточного и внеклеточного транспорта [7]. Через механизм эндоцитоза митохондрии попадают в сенсорные обонятельные нейроны или веточки тройничного нерва и по аксонам переносятся в обонятельную луковицу или ствол мозга, где через трансинаптический механизм могут распределяться в другие мозговые области. Митохондрии могут попасть в мозг в потоке интерстициальной жидкости из перинейрального в субарахноидное пространство с цереброспинальной жидкостью. В

зависимости от времени после введения, митохондрии были обнаружены в мягкой мозговой оболочке, где они локализовались в лейкоцитах и макрофагах, в боковых желудочках мозга, в переднемозговом миграционном пути и в сосудистом сплетении гиппокампа и обонятельной луковицы [2-6]. Однако точный молекулярный механизм митохондриального переноса требует дальнейшего изучения.

В докладе обсуждаются дальнейшие направления исследований и возможные перспективы использования трансплантации митохондрий путем интраназального введения как новой терапевтической стратегии при БА, ПА и других нейродегенеративных заболеваниях, а также при старении организма, сопровождающейся снижением памяти.

Работа поддержана грантом РФ № 23-25-00441.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бобкова Н.В., Жданова Д.Ю., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. // Номер заявки 2019137519 от 02.09.2019 г. Патент РФ на изобретение RU2744453 С2 от 09.03.2021 г.
2. Bobkova N.V., Zhdanova D.Y., Belosludtseva N.V. et al. // *Experimental Biology and Medicine*. 2021. 247(5): 416-25.
3. Alexander J.F. et al. // *J. Theranostics*. 2021. 11(7): 3109-3130.
4. Chang J.C. et al. // *Scientific Reports*. 2021. 11: 10597.
5. Hosseini L., Karimipour M., Seyedaghamiri F. et al. // *J. Stroke Cerebrovasc Dis*. 2022. 31(12): 106801.
6. Alexander J.F. et al. // *Adv. Healthc. Mater*. 2022. 11(8): e2102153.
7. Prentice R.N., Rizwan S.B. // *Pharmaceutics*. 2023. 15(1): 233.

## ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ НЕПРЕРЫВНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Мишуков А.А.<sup>1,2</sup>, Мартьянов А.А.<sup>3</sup>, Свешникова А.Н.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дм. Рогачева, Москва, Россия

**Введение.** Тромбоциты являются мелкими клеточными элементами крови, чьей основной функцией является закрытие поврежденных стенок сосудов. Для реализации своей функции тромбоциты обладают способностью к активации: набору физиологических ответов (изменение

формы, синтез тромбоксана А<sub>2</sub>, секреция содержимого гранул, активация интегринов и т.д.), возникающих вследствие взаимодействия специфических индукторов (активаторов) с поверхностными рецепторами тромбоцитов [1]. Центральную роль в механизмах активации тромбоцитов занимает внутриклеточная кальциевая сигнальная система (PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> сигнальная система) [2].

Помимо функции «энергетических станций» митохондрии тромбоцитов играют ключевую роль в механизме формирования специфической субпопуляции прокоагулянтных тромбоцитов [4]. При сверхсильной активации, ведущей к перегрузке митохондрий кальцием, происходит последовательное открытие mPTP во всех митохондриях, запускающих mPTP-движимый некроз тромбоцитов [5]. Митохондриальная дисфункция может приводить к различным патологиям, ассоциированным с тромбоцитами. Так, у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича тромбоциты имеют пониженное количество митохондрий, что вызывает преждевременную гибель тромбоцитов по пути mPTP-движимого некроза и приводит к формированию тромбоцитопении [6].

Поскольку внутриклеточная кальциевая сигнализация и активность митохондрий в тромбоцитах тесно связаны, мы дополнили методику исследования внутриклеточной кальциевой сигнализации [8] отслеживанием активности митохондрий тромбоцитов по изменению уровня мембранного потенциала, что и представлено в данной работе.

**Материалы и методы.** В исследованиях были использованы следующие реактивы: флуорофоры Fura Red (Invitrogen, США), DiOC<sub>3</sub>(6) (Sigma, США), Al647 (Lumiprobe, Россия), человеческий фибриноген (Sigma, США), активаторы тромбоцитов АДФ (Sigma, США), TRAP-6 (PAR1-активирующий пептид) (Sigma, США), фукоидан (Sigma, США), иономицин (Sigma, США), СССР (Sigma, США). Олигомицин был любезно предоставлен Э.Л. Холмухамедовым из ИТЭБ РАН (г. Пущино, МО, Россия). Для работы использовалась венозная кровь, отобранная у взрослых добровольцев в пробирки, содержащие цитрат натрия в качестве антикоагулянта. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинской Декларацией.

Исследование внутриклеточной кальциевой сигнализации проводилось методом непрерывной проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) в суспензии тромбоцитов в физиологическом буфере Тирода (NaCl 134 мМ, KCl 2.7 мМ, MgCl<sub>2</sub> 1 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.36 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 12 мМ, глюкоза 5.56 мМ с добавлением 0.36% бычьего сывороточного альбумина, 20 мМ HEPES и 2 мМ CaCl<sub>2</sub>). Более подробное описание методики изложено в [8]. Уровень внутриклеточного кальция оценивался по соотношению Ca<sup>2+</sup>-связанной и Ca<sup>2+</sup>-свободной форм Fura Red (R<sub>FuraRed</sub>). Связывание фибриногена



оценивалось по флуоресценции фибриногена, конъюгированного с флуорофором Al-647 (аналог флуорофора Alexa-647), изменение формы тромбоцитов оценивалось по изменению параметра бокового светорассеивания (SSC). Параметры связывания фибриногена и изменения формы нормировались на уровень до активации (базовая линия). Активность митохондрий оценивалась по изменению флуоресценции DiOC<sub>3</sub>(6), которая отражала уровень мембранного потенциала. уровень мембранного потенциала митохондрий тромбоцитов до активации (базовая линия) приравнивался к 100%.

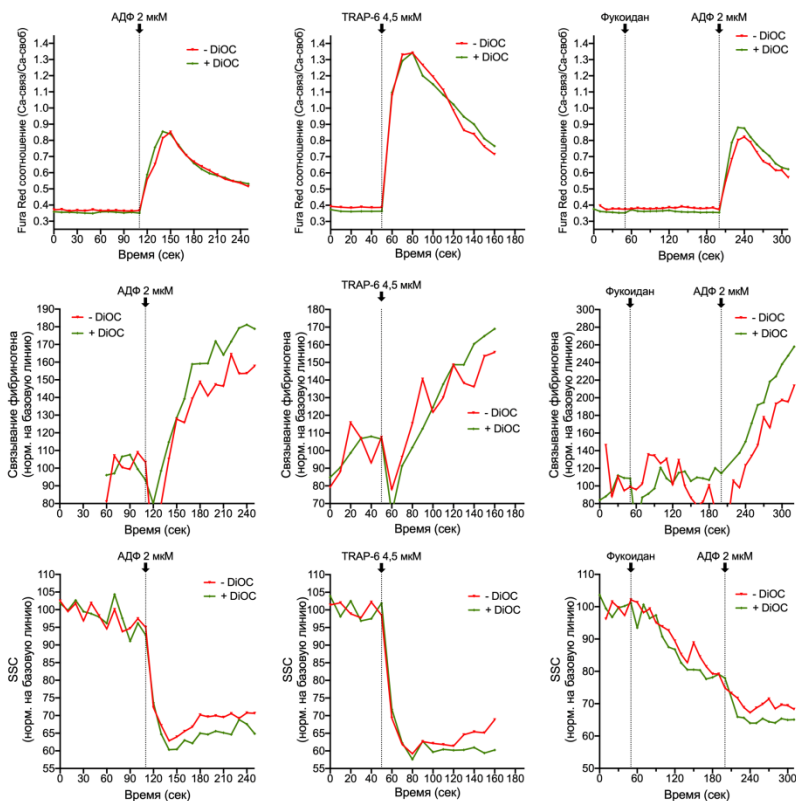
Обработка первичных данных проводилась с помощью программы FlowJo и программных пакетов в среде Python 3.8. Для построения графиков использовалась программа GraphPad Prizm 9.

**Результаты и обсуждение.** Подготовка тромбоцитов к исследованию внутриклеточной кальциевой сигнализации включает два этапа: 1) окрашивание цельной крови 2 мкМ кальций-чувствительного флуорофора Fura Red в присутствии 100 МЕ/мл гирудина и 1 U/мл апиразы в течение 35 минут при 37°C; 2) разбавление лейкоцит богатой плазмы в буфере Тирода и «отдых» тромбоцитов в течение 40 минут. Мы добавили нагрузку тромбоцитов потенциал-чувствительным флуорофором DiOC<sub>3</sub>(6) на стадии «отдыха» тромбоцитов.

Наиболее оптимальной оказалась концентрация DiOC<sub>3</sub>(6) в 40 нМ. В данной концентрации DiOC<sub>3</sub>(6) дает наиболее выраженные изменения флуоресценции при добавлении 5 мкг/мл олигомицина (ингибитора митохондриальной FoF1-АТФазы, вызывающего гиперполяризацию митохондрий) и 5 мкМ СССР (протонофора, вызывающего депольяризацию митохондрий).

После подбора условий окрашивания тромбоцитов флуорофорами Fura Red и DiOC<sub>3</sub>(6) мы проверили влияние DiOC<sub>3</sub>(6) на результаты исследования внутриклеточной сигнализации. На рис. 1 показаны графики изменения концентрации внутриклеточного кальция (верхний ряд), связывания фибриногена (средний ряд) и изменения формы (нижний ряд) тромбоцитов нагруженных и не нагруженных 40 нМ DiOC<sub>3</sub>(6). Значимых отличий в изменениях уровня внутриклеточного кальция, связывания фибриногена и изменения формы при активации АДФ, TRAP-6 и фукоиданом между тромбоцитами, нагруженными только Fura Red, и тромбоцитами, нагруженными Fura Red и DiOC<sub>3</sub>(6), мы не обнаружили.

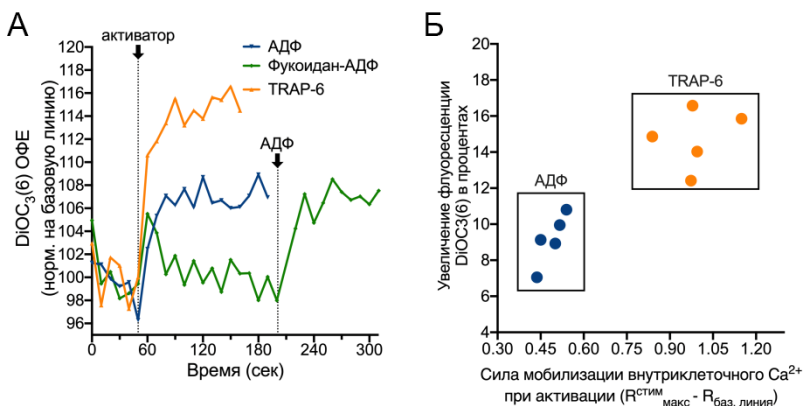
Единственное, что стоит отметить, так это то, что флуоресценция DiOC<sub>3</sub>(6) регистрируется не только в канале FITC (530 ± 20 нм), но и в канале PerCP (660 ± 20 нм), увеличивая сигнал от Ca<sup>2+</sup>-свободной формы Fura Red примерно на 20% (данные не показаны), тем самым занижая соотношение  $R_{FuraRed}$ . Данная проблема решается применением компенсации.



**Рис. 1.** DiOC<sub>3</sub>(6) не влияет на активацию тромбоцитов. Сравнение кальциевой сигнализации (R<sub>FuraRed</sub>), связывания фибриногена и изменения формы (SSC) в тромбоцитах, нагруженных DiOC<sub>3</sub>(6) (зеленые кривые) и не нагруженных DiOC<sub>3</sub>(6) (красные кривые).

При активации тромбоцитов классическими агонистами (АДФ, TRAP-6, фукоидан) происходит резкое увеличение флуоресценции DiOC<sub>3</sub>(6) (рис. 2А), что отражает увеличение мембранного потенциала и повышение активности митохондрий [5,9]. При этом степень гиперполяризации зависит от силы активации внутриклеточной кальциевой сигнализации. На рис. 2Б представлен график корреляции между амплитудой кальциевой стимуляции и увеличением флуоресценции DiOC<sub>3</sub>(6). Наиболее сильная гиперполяризация митохондрий (увеличение флуоресценции DiOC<sub>3</sub>(6) на 15±1%) наблюдается при активации тромбоцитов пептидом TRAP-6 (4.5 мкМ),

который индуцирует увеличение  $R_{FuraRed}$  на  $0.94 \pm 0.09$  единиц (среднее по трём донорам). АДФ (2 мкМ) индуцирует меньшее увеличение  $R_{FuraRed}$  на  $0.49 \pm 0.05$  единиц (среднее по трём донорам), и соответственно наблюдаемая гиперполяризация ниже (увеличение флуоресценции  $DiOC_3(6)$  на  $9 \pm 2\%$ ) чем при стимуляции TRAP-6. Наиболее слабым активатором в наших экспериментах является фукоидан (агонист рецепторов CLEC-2), фукоидан практически не вызывает гиперполяризацию митохондрий.



**Рис. 2.** Степень гиперполяризации митохондрий тромбоцитов зависит от силы активации внутриклеточной кальциевой сигнализации. А, Динамика изменения флуоресценции  $DiOC_3(6)$  при активации тромбоцитов 2 мкМ АДФ (синяя кривая), 4.5 мкМ TRAP-6 (желтая кривая) и при последовательной активации 250 мкг/мл фукоидана и 2 мкМ АДФ (зеленая кривая); Б, корреляция между степенью гиперполяризации митохондрий и силой внутриклеточной кальциевой сигнализации, индуцированной агонистами АДФ (2 мкМ) и TRAP-6 (4.5 мкМ) у пяти здоровых доноров.

**Заключение.** Таким образом можно заключить, что дополнительная нагрузка тромбоцитов чувствительным к митохондриальному потенциалу флуорофором не влияет на кальциевую сигнализацию и степень активации тромбоцитов. Результаты исследований на здоровых добровольцах показывают, что степень гиперполяризации митохондрий отражает мобилизацию кальция, вызванную активатором. Разработанная методика может быть использована для оценки состояния митохондрий пациентов с тромбоцитопатиями потребления.

Работа была поддержана грантом фонда «Наука-детям».

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Martyanov A., Pantelev M.* // Syst. Biol. Physiol. Rep. 2021. 1(3): 13-30.
2. *Sveshnikova A., Stepanyan M., Pantelev M.* // Syst. Biol. Physiol. Rep. 2021. 1(1): 20-8.
3. *Kholmukhamedov A., Jobe S.* // Blood Adv. 2019. 3(4): 599-602.
4. *Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A. et al.* // Hämostaseologie. 2021. 41(02): 146-53.
5. *Obydennyi S.I., Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A.* // J. Thromb. Haemost. 2016. 14(9): 1867-81.
6. *Obydennyi S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N. et al.* // Haematologica. 2020. 105(4): 1095-106.
7. *Baaten C.C.F.M.J., Moenen F.C.J.I., Henskens Y.M.C. et al.* // Haematologica. 2018. 103(9): 1557-67.
8. *Martyanov A., Morozova D., Sorokina M. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21(9): 3035.
9. *Choo H.J., Saafir T.B., Mkumba L. et al.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012. 32(12): 2946-55.

## УСТОЙЧИВАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ У ДРОЖЖЕЙ

*Муравьёв Г.С.<sup>1</sup>, Кашко Н.Д.<sup>2</sup>, Кнорре Д.А.<sup>2</sup>*

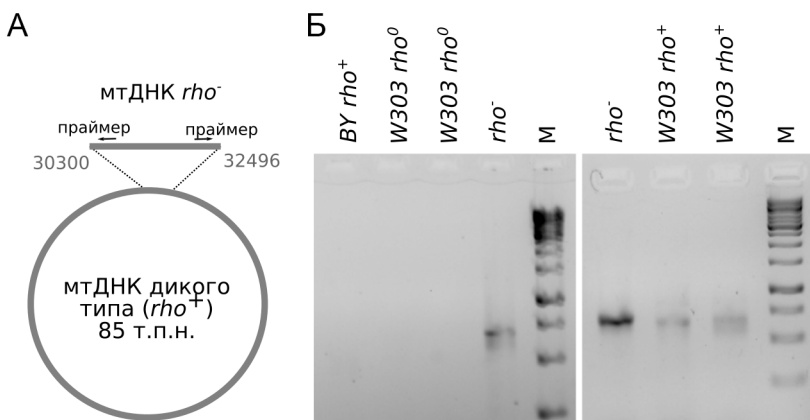
<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Когда в одной эукариотической клетке присутствует два или более вариантов мтДНК с разной нуклеотидной последовательностью говорят, что данная клетка находится в состоянии гетероплазии. С митохондриальной гетероплазией сопряжено большое число генетических заболеваний человека [1]. Поэтому, изучение закономерностей наследования мтДНК в череде поколений клеток и многоклеточных организмов представляет как общий, так и прикладной интерес.

При делении клетки разные варианты мтДНК обычно распределяются между новыми клетками случайным образом. Если оба варианта мтДНК эквивалентны, то через несколько поколений клетки из состояния гетероплазии должны переходить в состояние гомоплазии за счёт случайного дрейфа [2]. Однако для некоторых организмов описаны случаи стабильной гетероплазии, сохраняющейся в череде числа многих поколений, в частности у нематод [3], плодовых мушек [4] и птиц [5]. Как

правило, стабильная гетероплазмия сопряжена с сосуществованием варианта мтДНК дикого типа и варианта мтДНК с вредной мутацией, который обладает преимуществом в скорости репликации в клетке. В своей работе мы исследовали возможность поддержания стабильной гетероплазмии в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в ситуации, когда в клетках присутствуют мтДНК дикого типа *rho*<sup>+</sup> и вариант мтДНК с обширной делецией *HS rho*<sup>-</sup>, сохранивший лишь небольшой фрагмент мтДНК (30300-32496), включающий в себя два ориджина репликации [6].



**Рис. 1.** Идентификация *rho*<sup>-</sup> варианта мтДНК с помощью ПЦР. (А) Координаты *rho*<sup>-</sup> варианта мтДНК с обширной делецией – сохранился только участок соответствующий позициям 30300-32496 карты *rho*<sup>+</sup> мтДНК дикого типа. (Б) Продукты ПЦР с использованием праймеров, специфичных к *rho*<sup>-</sup> мтДНК. Специфичный продукт также наблюдается в случае *rho*<sup>+</sup> штамма *W303* (приведены два независимых штамма разных типов спаривания), но не в случае лабораторного штамма *BY4741*. Результаты репрезентативного опыта.

**Результаты и обсуждение.** Для идентификации варианта мтДНК с обширной делецией были написаны праймеры, комплементарные участкам мтДНК дрожжей вблизи координат делеции и направлены в сторону делеции (позиции ←30525/32063→, рис. 1А). Образование продукта ПЦР с этой парой праймеров возможно, только если в пробе присутствует *rho*<sup>-</sup> мтДНК. Мы обнаружили, что ПЦР с этими праймерами дает продукт, если в качестве матрицы используется ДНК *rho*<sup>-</sup> клеток (30300-32496). Однако ПЦР приводила к образованию продукта и в том случае, когда в качестве матрицы использовалась тотальная ДНК дикого типа *rho*<sup>+</sup> штамма *W303-1A* (рис. 1Б). Мы не детектировали ПЦР продукта с этими праймерами, если в качестве матрицы использовали тотальную ДНК из другого стандартного лабораторного штамма *BY4741* или из *rho*<sup>0</sup> штамма, в котором отсутствовала мтДНК. Для контроля качества

выделения ДНК, мы использовали праймеры к консервативным участкам мтДНК и показали, что ПЦР с этими праймерами дает продукт, если в качестве матрицы используется ДНК, выделенная из клеток дикого типа, и не дает продукта, если в качестве матрицы используют тотальную ДНК из  $rho^0$  и  $rho^-$  клеток. Стоит отметить, что клетки дрожжей практически лишены митохондриально-ядерных псевдогенов [7]. Отсутствие продукта при использовании тотальной ДНК из штаммов *W303 rho<sup>0</sup>* косвенно подтверждает отсутствие псевдогенов мтДНК в ядерном геноме и специфичность подобранной пары праймеров к мтДНК.

Мы проанализировали результаты полногеномного секвенирования  $rho^+$  *W303-1A* штамма дрожжей, ранее полученного в нашей лаборатории. Анализ результатов позволил выявить кластер несогласующихся парных чтений (discordant paired-end reads), в которых отдельные чтения были направлены в разные стороны и картировалась на участок мтДНК в области 32496-30300.

Наличие таких несогласованных чтений, а также результат ПЦР, свидетельствуют о том, что в гаплоидном штамме дрожжей дикого типа *W303-1A* уже присутствуют варианты мтДНК, с делецией, с приблизительно теми же координатами (32496-30300). Это возможно, если высока вероятность выщепления этого участка мтДНК из полноразмерной мтДНК. Возможно, что такие (32496-30300)  $rho^-$  мтДНК способны сохраняться длительное время в клетках в состоянии гетероплазмии за счет преимущества в скорости репликации внутри клетки и, поэтому, сопутствуют мтДНК дикого типа в штаммах *W303-1A*, использованных в работе.

Чтобы непосредственно проверить такую возможность, мы скрестили  $rho^-$  клетки дрожжей с  $rho^+$  клетками дикого типа, в которых отсутствовала сопутствующая  $rho^-$  мтДНК 32496-30300. Используя праймеры для определения  $rho^-$  варианта мтДНК с делецией, мы показали, что  $rho^-$  мтДНК сохраняется в полученных диплоидных линиях клеток в течение нескольких поколений. В семи из десяти клеток, прошедших более 20 делений после скрещивания, мы с помощью ПЦР смогли обнаружить  $rho^-$  мтДНК.

Наши результаты показывают, что в клетках дрожжей возможна ситуация, когда мутантный эгоистичный вариант мтДНК с обширной делецией сопутствует мтДНК дикого типа в течение множества поколений. Мы предполагаем, что наличие такого варианта является важным фактором, дестабилизирующим митохондриальный геном дрожжей. Наличие такого варианта может служить причиной активации ретроградного сигнального пути, передающему информацию от митохондрий к ядру в условиях митохондриальной дисфункции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-14-00108).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wallace D.C., Chalkia D. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. 5(11): a021220.
2. Rand D.M. // Annu. Rev. Ecol. Syst. Annual Reviews. 2001. 32(1): 415-48.
3. Howe D.K., Baer C.F., Denver D.R. // Genome Biol. Evol. 2009. 2: 29-38.
4. Salignac M., Monnerot M., Mounolou J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. 80(22): 6942-6.
5. Rollins L.A. Woolnough A.P., Fanson B.G. et al. // Mol. Biol. Evol. 2016. 33(4): 995-1007.
6. Karavaeva I.E., Golyshev S.A., Smirnova E.A. et al. // J. Cell Sci. 2017. 130(7): 1274-84.
7. Richly E., Leister D. // Mol. Biol. Evol. 2004. 21(6): 1081-4.

### РЕГУЛЯЦИЯ ЧИСЛА КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ДРОЖЖЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ДНК С ОБШИРНЫМИ ДЕЛЕЦИЯМИ

Потапенко Е.Ю.<sup>1</sup>, Кашко Н.Д.<sup>2</sup>, Кнорре Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

**Введение.** В клетках эукариот митохондриальная ДНК (мтДНК) присутствует во множестве копий. Например, у человека содержится до десятков тысяч молекул мтДНК на клетку в зависимости от ткани [1]. Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным объектом для исследований мтДНК, так как могут пролиферировать как с обширными делециями в мтДНК (*rho*<sup>-</sup>), так и в том случае, если мтДНК полностью отсутствует (*rho*<sup>0</sup>) [2]. Для гаплоидных клеток *S. cerevisiae* дикого типа характерно от 10 до 50 молекул мтДНК на клетку, в то же время диплоидные клетки могут содержать в себе до 200 молекул мтДНК [3]. Количество копий мтДНК зависит от штамма и от условий, в которых он культивируется (например субстрата и плотности культуры), однако в одинаковых условиях количество копий мтДНК поддерживается на постоянном уровне [4].

мтДНК может реплицироваться независимо от ядерной ДНК (ядДНК): было показано, что мтДНК реплицируется во всех фазах клеточного цикла [5]. Однако, если бы мтДНК реплицировалась, никак не синхронизуясь с ядерной, происходил бы дрейф значений соотношения мтДНК/ядДНК. Такого дрейфа не происходит, поэтому предполагается, что в клетке работают системы обратной связи, ограничивающие как избыточное накопление, так и потерю мтДНК ниже нужного числа копий. До сих пор остается во многом неизвестно, что это за механизмы контроля

количества мтДНК в клетке и как они работают [6]. В клетках эукариот функционирует несколько механизмов ретроградной сигнализации – передачи сигнала от митохондрий к ядру в условиях митохондриальной дисфункции [7], возможно, некоторые из них контролируют число копий мтДНК клетку.

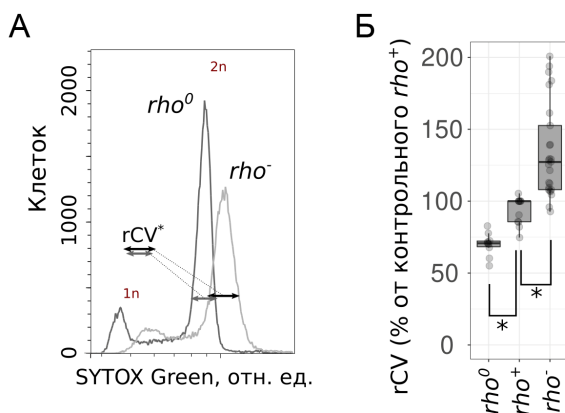
Мы предположили, что мутантные варианты мтДНК, в которых делетирована часть генов (*rho*<sup>-</sup>) окажутся выведенными из-под контроля механизмов, регулирующих число копий мтДНК на клетку. Чтобы это проверить, мы оценили число копий мтДНК в индивидуальных клетках *rho*<sup>0</sup> штаммов дрожжей с обширными делециями в мтДНК и штаммов дикого типа (*rho*<sup>+</sup>), содержащих функциональную мтДНК без делеций.

**Материалы и методы.** Для оценки содержания мтДНК в индивидуальных клетках мы использовали два подхода: один из них был основан на измерении тотальной ДНК по флуоресценции ДНК-интеркалирующего флуоресцентного зонда SYTOX Green с помощью проточной цитометрии. Такое сравнение возможно, так как ядерный геном относительно компактный (около 16 млн. пар нуклеотидов), а мтДНК, наоборот, длинная (75-85 тыс. пар нуклеотидов) по сравнению с мтДНК животных. Поэтому, с учетом того, что мтДНК содержится в клетках в десятках копий, мтДНК составляет 10-15% от всей ДНК клетки и изменение количества экземпляров молекул мтДНК заметно влияет на количество всей ДНК в клетке. Второй подход был основан на оценке интенсивности сигнала ДНК-интеркалирующего флуоресцентного зонда DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в цитоплазме клеток с помощью флуоресцентной микроскопии.

Мы использовали *rho*<sup>-</sup> штаммы пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, ранее полученные в нашей лаборатории [8]. В качестве контроля мы также использовали *rho*<sup>0</sup> клетки, в которых мтДНК отсутствовала. Клетки всех штаммов выращивали в YPD при 30°C до экспоненциальной фазы роста, затем фиксировали 70% EtOH. Далее количество мтДНК в индивидуальных клетках оценивал двумя способами. (1) фиксированные клетки окрашивали SYTOX Green по протоколу, предназначенному для оценки фаз клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии, описанному в [9,10]. Гетерогенность индивидуальных клеток в популяции оценивали, измеряя гCV (устойчивый коэффициент вариации) интенсивности флуоресценции 2n пика (клеток в G2 фазе клеточного цикла). (2) фиксированные клетки окрашивали DAPI и измеряли флуоресценцию цитоплазмы на микрофотографиях, затем сравнивали CV интенсивностей флуоресценции цитоплазмы в выборке клеток каждого штамма. Этот метод по сравнению с проточной цитофлуориметрией охватывает меньшую выборку клеток, зато позволяет оценивать флуоресценцию только цитоплазмы без ядра, что повышает точность результатов.



**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 показаны значения rCV интенсивности сигнала SYTOX Green для суспензий клеток  $rho^-$  и  $rho^0$  штаммов, нормализованные на соответствующее значение для родительского контрольного  $rho^+$  штамма. Значение rCV (~ширина 2n пика на гистограмме) для  $rho^0$  штаммов оказалось ниже, чем у  $rho^-$  и  $rho^+$  штаммов. Это соответствует представлению о том, что существенный вклад в гетерогенность клеток, находящихся в одной фазе клеточного цикла, по общему содержанию ДНК вносят мтДНК. Значения rCV SYTOX Green для  $rho^-$  клеток в среднем оказалось больше, чем для  $rho^+$  клеток (рис. 1). Этот результат подтвердил наше предположение, что обширные делеции в мтДНК приводят к нарушению контроля её копийности.

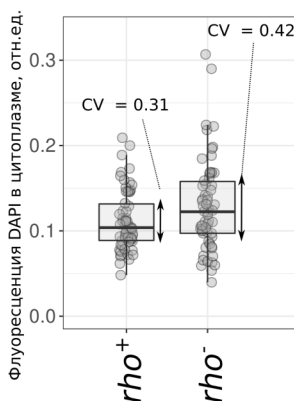


**Рис. 1.** Значения rCV содержания ДНК в отдельных клетках  $rho^0$ ,  $rho^+$  и  $rho^-$  штаммов дрожжей. А. Репрезентативная гистограмма распределения сигнала флуоресценции SYTOX Green в клетках дрожжей  $rho^0$  и  $rho^-$  штаммов позволяет оценить устойчивый коэффициент вариации (rCV). Б. Сравнение rCV SYTOX Green, соответствующего 2n пику  $rho^0$ , и  $rho^-$  штаммов дрожжей, и нормированного на значение rCV контрольного  $rho^+$  штамма. \*  $p < 0.05$  согласно критерию Уилкоксона.

Мы сравнили значения rCV SYTOX Green для разных  $rho^-$  штаммов, имеющих различные делеции в мтДНК. Ранее мы определили координаты этих делеций. Проанализированные  $rho^-$  штаммы демонстрировали заметно различающийся уровень популяционной гетерогенности по содержанию мтДНК/клетку (rCV SYTOX Green для 2n пика). Однако нам не удалось обнаружить связь между тем, какой участок мтДНК сохранился и уровнем гетерогенности клеток по содержанию мтДНК. Для того, чтобы проверить, что увеличенные значения rCV общего содержания ДНК в клетках в исследованных  $rho^-$  штаммах связана с мтДНК, а не с возникшей,

например, нестабильной анеуплоидией, мы удалили мтДНК в одном из штаммов (получили  $rho^0$  штамм) и показали, что в этом случае гCV снижается.

Чтобы исключить вклад немитохондриальной ДНК, мы оценили содержание мтДНК в отдельных клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентная микроскопия позволяет оценить сигнал от ДНК-интеркалирующего зонда (DAPI) в цитоплазме, исключив сигнал от яДНК. На рис. 2 приведены значения интегральной интенсивности флуоресценции DAPI в цитоплазме клеток  $rho^+$  штамма и  $rho^-$  штамма. Коэффициент вариации значений сигнала DAPI в  $rho^-$  клетках в 1.35 раз превышал соответствующее значение  $rho^+$ . Этот результат согласуется с результатом, полученным с помощью проточной цитометрии, и иллюстрирует повышенную гетерогенность клеток по содержанию мтДНК, если эти мтДНК имеют обширную делецию.



**Рис. 2.** Интенсивности флуоресценции ДНК-интеркалирующего зонда DAPI в цитоплазме отдельных клеток  $rho^+$  и  $rho^-$  штаммов дрожжей. На рисунке точки соответствуют интенсивности сигнала в отдельных клетках. Для каждого из штаммов приведены коэффициенты вариации.

Таким образом, мы двумя методами показали, что клетки  $rho^-$  штаммов, не имеющих функциональной дыхательной цепи, в среднем более разнородны по содержанию мтДНК/клетку, чем клетки дикого типа  $rho^+$ . Это говорит о том, что в самой мтДНК закодированы факторы, корректирующие её копияность. Мы предполагаем, что такими факторами могут быть стандартные митохондриальные гены, кодирующие рРНК, тРНК или белки дыхательной цепи. Потеря любого из них в результате делеции приводит к нарушению функции митохондрий, что делает невозможным координацию репликации мтДНК и яДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-14-00108).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Reynier P. et al.* // Mol. Hum. Reprod. 2001. 7(5): 425-9.
2. *Contamine V., Picard M.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. 64(2): 281-315.
3. *Puddu F. et al.* // Nature. 2019. 573(7774): 416-20.
4. *Galeota-Sprung B., Fernandez A., Sniegowski P.* // R. Soc. Open. Sci. 2022. 9(7): 211842.
5. *Newlon C.S., Fangman W.L.* // Cell. 1975. 5(4): 423-8.
6. *Moraes C.T.* // Trends Genet. 2001. 17(4): 199-205.
7. *Knorre D.A. et al.* // Microb. Cell. 2016. 3(11): 532-9.
8. *Karavaeva I.E. et al.* // J. Cell Sci. 2017. 130(7): 1274-84.
9. *Haase S.B., Lew D.J.* // Methods Enzymol. 1997. 283: 322-32.
10. *Haase S.B.* // Curr. Protoc. Cytom. 2004. Chapter 7: Unit 7.23.

### ОСОБЕННОСТИ СТИМУЛЯЦИИ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ КАТИОННЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И $\alpha,\omega$ -ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова Е.К., Дубинин М.В.*

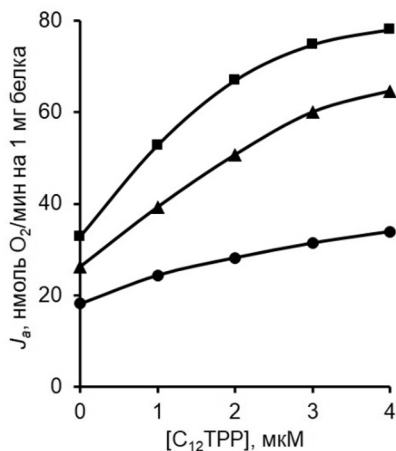
Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

**Введение.** Понятие «свободное дыхание (окисление)» в митохондриях было введено В.П. Скулачевым для обозначения механизмов разобщенного и первично не сопряженного с запасанием энергии дыхания [1,2]. В качестве основных функций свободного дыхания в митохондриях рассматриваются продукция тепла для поддержания температуры тела у теплокровных животных и ингибирование продукции активных форм кислорода [1-3]. Основным механизмом свободного дыхания в митохондриях является пассивная утечка протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, которая может быть усилена свободными монокарбоновыми жирными кислотами (мягкое разобщение) [1-3]. Такое разобщающее действие жирных кислот и связанное с этим ингибирование продукции активных форм кислорода в митохондриях может быть усилено с помощью проникающего катиона додецилтрифенилфосфония ( $C_{12}TRP$ ) заряд которого делокализован [3]. Предполагается, что катион  $C_{12}TRP$  содействует перемещению аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя внутренней мембраны митохондрий на наружный монослой как лимитирующей стадии процесса разобщения [3]. В опытах на бислойной плоской фосфолипидной мембране было установлено, что в отличие от  $C_{12}TRP$  катион цетилтриметиламмония (ЦТМА), заряд которого локализован, не способен переносить анионы жирных кислот [3].

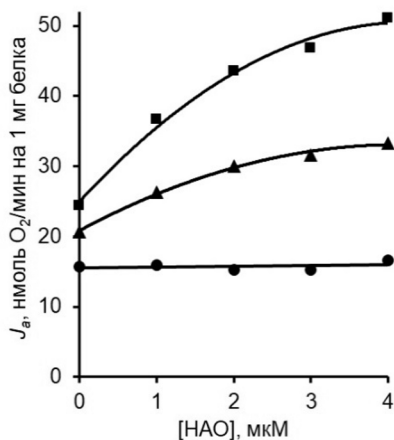
Одним из путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их  $\omega$ -окисление, происходящее, главным образом, в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих  $\alpha,\omega$ -дикарбоновых кислот [4]. Так в процессе  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты (одна из наиболее распространенных природных жирных кислот) образуется  $\alpha,\omega$ -гексадекадидикарбоновая кислота (ГДК). Накопление продуктов  $\omega$ -окисления жирных кислот в крови и клетках у людей и экспериментальных животных наблюдается при различных патологических состояниях связанных с нарушениями липидного и углеводного обменов [4]. Ранее нами было установлено, что ГДК стимулирует свободное дыхание митохондрий печени путем переключения комплекса III ( $bc_1$ -комплекс) дыхательной цепи на холостой режим работы – десопрягающее действие [5]. Наряду с этим ГДК эффективно ингибируют генерацию пероксида водорода [5,6]. Такие эффекты ГДК в отличие от действия монокарбоновых жирных кислот не связаны с усилением пассивной утечки протонов через внутреннюю мембрану митохондрий [5]. Представляет интерес исследовать влияние  $C_{12}$ TRP на стимуляцию дыхания митохондрий печени ГДК, а также сравнить эффект этого катиона с аналогичными эффектами других амфифильных катионов: 10*N*-нонил-3,6-бис(диметиламино) акридинового оранжевого (НАО) и ЦТМА.

**Материалы и методы.** Митохондрии из печени животных выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина фракции V в соответствии с описанной ранее методикой [7]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-Tris (pH 7.4). Дыхание митохондрий (1.0 мг белка/мл) регистрировали полярографическим методом при 37°C как в работе [5]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). Удельную активность ГДК ( $V_a$ ) определяли как отношение величины стимуляции дыхания ( $\Delta J$ ) этой кислотой к ее концентрации [ $a$ ] по формуле:  $V_a = \Delta J/[a]$ .

**Результаты и их обсуждение.** Как видно из рис. 1, в отсутствие ГДК 4 мкМ  $C_{12}$ TRP стимулирует дыхание митохондрий печени в состоянии 4 на 70%, что соответствует известным литературным данным [3]. Эффект  $C_{12}$ TRP значительно усиливается в присутствии ГДК. Так уже в присутствии 20 мкМ ГДК 4 мкМ  $C_{12}$ TRP стимулирует дыхание митохондрий на 130%.



**Рис. 1.** Зависимость скорости дыхания митохондрий печени ( $J_a$ ) от концентрации  $C_{12}TPP$  в отсутствие (●) и присутствии: 20 мкМ (▲) и 40 мкМ (■) ГДК. Здесь и далее на рис. 2 и 3 представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах.



**Рис. 2.** Зависимость скорости дыхания митохондрий печени ( $J_a$ ) от концентрации НАО в отсутствие (●) и присутствии: 20 мкМ (▲) и 40 мкМ (■) ГДК.

НАО представляет собой амфифильный катион, состоящий из акридинового флуорофора, к которому присоединен нониловый углеводородный хвост. Вследствие такой структуры НАО способен взаимодействовать со всеми кислыми фосфолипидами мембран (фосфотидилинозитолом, фосфотидилсеринном, кардиолипином), однако его сродство к кардиолипину более чем на два порядка выше его сродства к другим фосфолипидам [8,9]. Как видно из рис. 2, в отличие от C<sub>12</sub>TPP, НАО вплоть до концентрации 4 мкМ в отсутствие ГДК не влияет на дыхание митохондрий печени в состоянии 4. В то время как в присутствии 20 и 40 мкМ ГДК 4 мкМ НАО стимулирует дыхание на 60% и 95% соответственно. Обращает на себя внимание то, что в присутствии 20 и 40 мкМ ГДК зависимость скорости дыхания от концентрации НАО имеет гиперболический характер. Концентрация НАО, при которой наблюдается полумаксимальный эффект, и в том, и в другом случае составляет 2.5 мкМ.

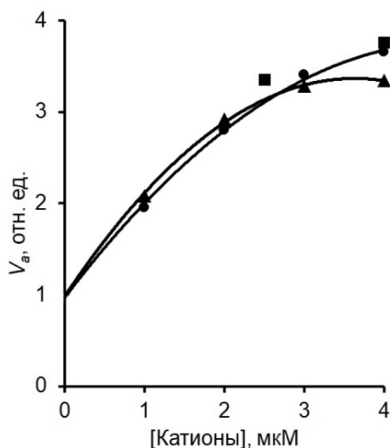
Как уже отмечалось во введении, ЦТМА, заряд которого локализован, не способен переносить анионы жирных кислот через фосфолипидный бислой [3]. Как видно из таблицы, ЦТМА вплоть до концентрации 10 мкМ не влияет на дыхание митохондрий печени в состоянии 4 (без ГДК), но уже в концентрации 2.5 мкМ стимулирует дыхание в присутствии 20 и 40 мкМ ГДК. В этом случае увеличение концентрации ЦТМА до 4 и 10 мкМ не приводит к дальнейшей стимуляции дыхания (табл. 1).

**Табл. 1.** Стимуляция дыхания митохондрий печени ГПК в отсутствие и в присутствии ЦТМА в различной концентрации.

ГДК, мкМ	ЦТМА, мкМ			
	0	2.5	4	10
Скорость дыхания, нмоль O <sub>2</sub> /мин на 1 мг белка				
0	18.4 ± 1.0	18.9 ± 0.7	18.7 ± 1.1	18.3 ± 0.7
20	21.7 ± 1.1	29.8 ± 0.8*	30.2 ± 1.7*	30.0 ± 0.6*
40	25.4 ± 1.6	38.6 ± 2.5*	39.3 ± 2.1*	39.5 ± 1.8*

**Примечание.** Условия опыта, состав среды инкубации и приведенные в таблице символы описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ( $n = 4$ ). \* – Различие между опытом (присутствие ЦТМА) и контролем (без ЦТМА) статистически значимы,  $p < 0.01$  (критерий Стьюдента).

Способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий может быть выражена количественно как удельная активность (см. раздел «Материалы и методы»). Как видно из рис. 3, применяемые нами амфифильные катионы эффективно и приблизительно в равной степени увеличивают активность ГДК.



**Рис. 3.** Зависимость разобщающей активности ГДК ( $V_{ГДК}$ , отн. ед.) от концентрации амфифильных катионов: НАО (▲),  $C_{12}TPP$  (●) и ЦТМА (■). В отсутствие амфифильных катионов абсолютные значения удельной активности ГДК составляют  $0.236 \pm 0.032$  мкМ  $O_2$ /мин на 1 мкМ ГДК ( $n = 9$ )

Таким образом, проведенные исследования показали, что амфифильные катионы:  $C_{12}TPP$ , НАО и ЦТМА усиливают способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий печени в состоянии 4. Можно предположить, что указанные амфифильные катионы способны образовывать подвижный нейтральный комплекс с анионом ГДК и тем самым содействовать усилению пассивной утечки протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Нельзя также исключить и то, что амфифильные катионы усиливают десопрягающее действие ГДК путем увеличения плотности положительных зарядов на поверхности внутренней мембраны митохондрий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Skulachev V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. 1363: 100-24.
2. Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. Principles of Bioenergetics. Springer-Verlag, Berlin. 2013: 436.
3. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N. et al. // Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107(2): 663-8.
4. Wanders R.J., Komen J., Kemp S. // FEBS J. 2011. 278: 182-94.
5. Semenova A.A., Samartsev V.N., Dubinin M.V. // Biochimie. 2021. 181: 215-25.
6. Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова С.И., Дубинин М.В. // Биол. мембраны 2019. 36(6): 428-38.
7. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. 1339: 251-7.
8. Maftah A., Petit J.M., Julien R. // FEBS Lett. 1990. 260(2): 236-40.
9. Petit J.M., Maftah A., Ratinaud M.H., Julien R. // Eur. J. Biochem. 1992. 209(1): 267-73.

# ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Nrf2 В ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТАХ

*Стельмацук О.А.<sup>1</sup>, Абрамов А.Ю.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Лаборатория клеточной физиологии и патологии  
научно-технологического центра биомедицинской фотоники  
ОГУ имени И.С. Тургенева

<sup>2</sup>Department of Clinical and Movement Neurosciences,  
UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

**Введение.** Активация транскрипции Nrf2 является перспективной терапевтической стратегией при нейродегенеративных заболеваниях вследствие важности данного белка для поддержания антиоксидантной защиты клетки, запуска аутофагии и активации протеасом. Кроме того, метаболическая и митохондриальная дисфункции клетки являются типовыми патологическими изменениями для данной группы заболеваний и также могут быть купированы активацией Nrf2 [1]. Активация Nrf2 улучшает биоэнергетические свойства клеток за счет увеличения митохондриального мембранного потенциала (ММП), доступности дыхательных субстратов и продукции АТФ в митохондриях, что важно для компенсации высоких энергозатрат нейронов. Было показано, что активация Nrf2 полезна в моделях болезни Паркинсона PINK1 и MPTP, связанных с дисфункцией комплекса I, а также нарушением доступности его субстрата. Важно отметить, что активация Nrf2 увеличивает выработку АТФ в нейронах и астроцитах за счет активации доставки субстратов NADH и FADH<sub>2</sub> в митохондриях [2,3]. Повышение продукции энергии за счет активации Nrf2 демонстрировало защитное действие для нейронов в нескольких моделях нейродегенеративных заболеваний и эпилепсии [4,5]. При этом генетическая активация Nrf2 с повышением уровней содержания NADH и NAD(P)H проявляется более выражено в астроцитарном типе клеток [6]. В данной работе для оценки влияния на энергетический метаболизм исследовалась фармакологическая активация Nrf2 в клеточной культуре астроцитов мозга крыс.

**Материалы и методы.** Первичная астроцитарная культура была получена из клеток мозга новорожденных крыс линии Вистар, как описано ранее [38]. Были подготовлены три независимые культуры. Все работы с животными по выделению и приготовлению срезов головного мозга одобрены этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 18 от 21.02.2020 г.) в соответствии с законодательством Российской Федерации.

После выделения мозг помещали в охлажденный сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) с pH 7.4 и солевой

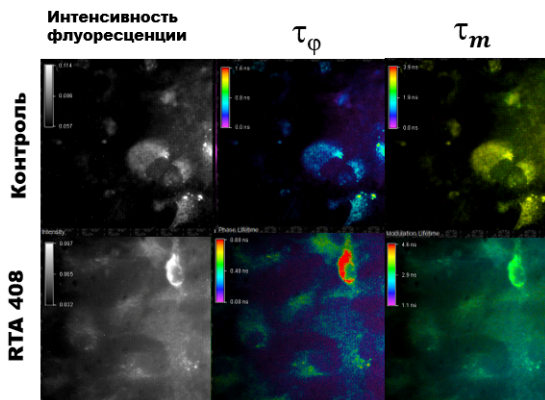


раствор (HBSS). Затем ткань подвергали трипсинизации (0.05% трипсин/ЭДТА) в течение 15 мин при 37°C, гомогенизировали, гранулировали, ресуспендировали, высевали в колбы T75 и выдерживали в астроглиальной среде, содержащей DMEM с 2 мМ глутамакса в присутствии пенициллина/стрептомицина и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Культуры пересаживали на 7-й день с использованием трипсина и помещали на покровные стекла предварительно покрытые поли-D-лизином (Sigma-Aldrich, Великобритания). Культуры поддерживали при 37°C во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Параметры времени жизни флуоресценции в первичной культуре астроцитов измеряли с помощью камеры pco.flim FLIM (PCO AG, Германия). Для получения изображения регистрировалась флуоресценция NAD(P)H исследуемых клеток. Использовался ультрафиолетовый лазер (375 нм/10 мВт) с амплитудной модуляцией на частоте 40 МГц. Световод (PCO AG, Германия) использовался для подачи лазерного излучения на микроскоп Olympus IX73P1F (Olympus Corp., Япония). Изображения клеток были получены и обработаны с помощью программного обеспечения NIS Elements AR версии 5.11 с плагином pco.flim. Визуализация проводилась с помощью флуоресцентных фильтров DC/ET455/50m и Optoscan P130/ELE/450 dichroic (Cairn Research Ltd., Великобритания) расположенных перед регистрирующей камерой. Полученные изображения интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции были обработаны в ImageJ на заключительном этапе. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Origin 2019 (Microcal Software Inc., США).

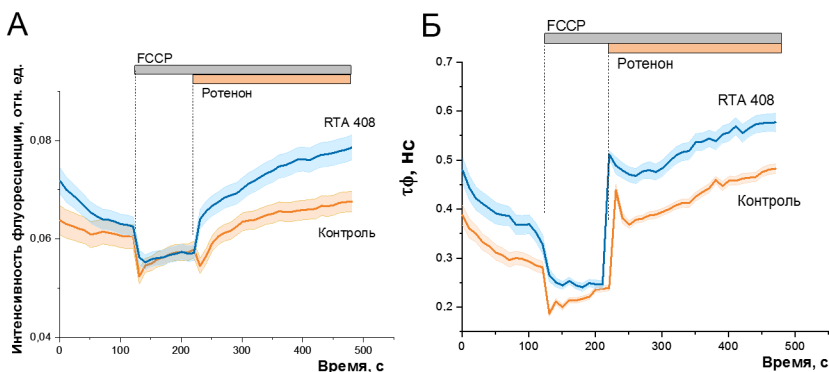
Калибровку производили по референсному раствору beta-Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt, hydrate (Acros organics, Германия) с концентрацией 500 мкМ и временем жизни 0.41 нс. Полученные результаты выражали в виде средних  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего значения). Поиск статистических различий проводили по критерию Манна-Уитни, при этом различия считались значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты.** Чтобы исследовать, приводит ли фармакологическая активация Nrf2 к изменениям уровня НАД(Ф)Н, первичные кортикальные астроциты обрабатывали 30 нМ омавелоксолоном (RTA 408) в течение 24 ч. RTA 408 является полусинтетическим тритерпеноидом и применяется как активатор транскрипционного фактора Nrf2 [7]. Препарат недавно был одобрен для лечения пациентов с атаксией Фридрайха в США. Примеры полученных изображений при визуализации регистрируемых параметров времени жизни флуоресценции астроцитов мозга крыс представлены на рис. 1.



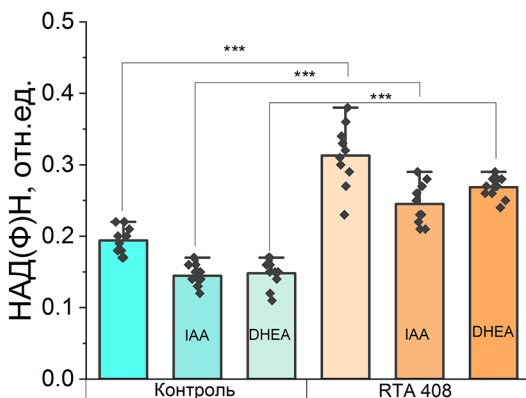
**Рис. 1.** Типовые примеры полученных изображений при визуализации регистрируемых параметров времени жизни флуоресценции астроцитов мозга крыс.

При анализе полученных данных было предположено, что изменения в времени жизни флуоресценции ( $\tau_\phi$ ), рассчитываемого на основе анализа сдвига фазы, после применения FCCP, который индуцирует митохондриальное потребление НАДН (рис. 2), может быть и характерным для изменений НАД(Ф)Н, поскольку НАДН минимален при обработке FCCP (рис. 2). Полученные значения  $\tau_\phi$  указывают на то, что активация *Nrf2* с помощью RTA 408 также увеличивает долю НАД(Ф)Н связанного с белками клетки.



**Рис. 2.** Типовые графики изменения аутофлуоресценции (А) и времени жизни флуоресценции  $\tau_\phi$  (Б) NAD(P)H после внесения разобщителя FCCP 1 мкМ и ингибитора комплекса I ротенона (5 мкМ).

Предварительная инкубация с ингибитором пентозофосфатного пути 100 мкМ дегидроэпиандростероном (DHEA) снижала уровни НАД(Ф)Н как в контрольных астроцитах, так и в астроцитах, обработанных RTA 408. Кроме того, предварительная инкубация клеток с ингибитором гликолиза (йодуксусная кислота (IAA), 20 мкМ) не приводила к увеличению НАД(Ф)Н в контроле и при обработке астроцитов RTA 408 (рис. 3).



**Рис. 3.** Фармакологическая активация Nrf2 повышает уровень НАД(Ф)Н в первичных астроцитах. Первичные астроциты обрабатывали фармакологическим активатором Nrf2 RTA 408 (30 нМ) в течение 24 ч. Уровни НАДФН в базальных условиях или перед инкубацией с ингибитором гликолиза IAA или ингибитором пентозофосфатного пути DHEA. Значения НАДФН были приняты за  $\tau_{\text{ф}}$ , связанный уровень времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н после внесения FCCP, 1 мкМ, когда весь митохондриальный НАДН расходуется. Двусторонний ANOVA с тестом Бонферрони для каждой группы, \*\*\* $p < 0.0001$ .

Следовательно, фармакологическая активация Nrf2 в астроцитах приводит к результатам, аналогичным тем, которые получены при генетической активации Nrf2, что дополнительно предполагает, что глюкоза не потребляется для поддержки антиоксидантной защиты, когда процессы гликолиза ингибируются.

**Выводы.** В исследовании было обнаружено, что астроциты крыс с активированным омавелоксолоном Nrf2 имеют более высокие уровни связанного с белками цитоплазматического НАДФН в сравнении с контрольными клетками.

Ингибирование гликолиза и пентозофосфатного пути приводило к снижению уровня НАДФН в контрольных астроцитах, при этом в клетках, подвергнутых активации Nrf2 эти значения были высокими, в связи с более высокими базовыми значениями.

Высокая значимость астроцитарного Nrf2 в поддержании здоровья нейронов связана с эпигенетическим подавлением Nrf2 во время развития нейронов. Этот факт свидетельствует об высокой уязвимости нейронов к окислительному стрессу и зависимости от астроцитарного Nrf2 для поддержания функций митохондрий. Фармакологическая активация Nrf2 в астроцитах может иметь защитную функцию для нейронов в условиях окислительного стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2022-1095.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kovac S., Angelova P.R., Holmström K.M. et al. // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2015. 1850(4): 794-801.
2. Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y. // Free Radic. Biol. Med. 2015. 88: 179-88.
3. Holmström K.M., Baird L., Zhang Y. et al. // Biol. Open. 2013. 2: 761-70.
4. Lipton S.A., Rezaie T., Nutter A. et al. // Cell Death Dis. 2016. 7: e2499.
5. Esteras N., Dinkova-Kostova A., Abramov A. // Biol. Chem. 2016. 397(5): 383-400.
6. Esteras N., Blacker T.S., Zhrebtsov E.A. et al. // Redox Biol. 2023. 62: 102672.
7. Abeti R., Baccaro A., Esteras N., Giunti P. // Front. Cell. Neurosci. 2018. 12: 188.

\*\*\*

Научное издание

Международная конференция (22-26 мая 2023 г.)

**РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ**

Сборник статей

Том 1

Под редакцией

А.В. Бережнова, В.П. Зинченко

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 10.05.2023. Формат 60x84<sub>1/16</sub> Бумага офсетная

Печать цифровая. Печ. л. 22,15.

Тираж 40 экз. Заказ 125.

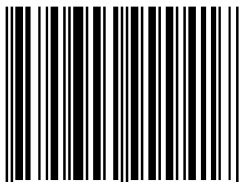
Типография Пятый Формат

г. Серпухов, ул. Водонапорная 36, оф. 224.

тел.: 8 916 648 21 98

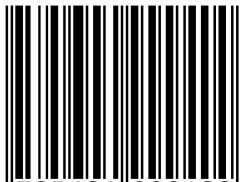
e-mail: [studio@5format.ru](mailto:studio@5format.ru)

ISBN 978-5-6049994-1-7



9 785604 999417

ISBN 978-5-6049994-0-0



9 785604 999400

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК –  
ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

# РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

22–26 мая 2023 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 2

Под редакцией  
А.В. Бережнова, В.П. Зинченко

Пушино  
2023

УДК 576.3  
ББК 28.05  
Р 45

Состав научного оргкомитета:  
д.б.н., проф. *Зинченко В.П.* – председатель,  
к.б.н. *Бережнов А.В.*, к.б.н. *Федотова Е.И.*,  
чл.-корр. РАН, проф. *Колесников С.С.*

Локальный оргкомитет:  
к.б.н. *Надеев А.Д.*, к.б.н. *Мальцева В.Н.*, к.б.н. *Теплов И.Ю.*,  
к.б.н. *Гайдин С.Г.*, к.б.н. *Косенков А.М.*, *Ларюшкин Д.П.*, *Крицкая К.А.*

**Р45** **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2.** /  
Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко – Серпухов:  
Типография Пятый Формат, 2023. – 381 с.

ISBN 978-5-6049994-2-4 (Т. 2)  
ISBN 978-5-6049994-0-0

С 22 по 26 мая 2023 г. в г. Пущино проходила Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены тексты 152 статей по материалам докладов участников конференции.

В первый том вошли разделы:

- общие вопросы сигнализации;
- кальциевая сигнализация;
- сигнализация в мышечных клетках и нейронах;
- внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация;
- сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика.

Второй том содержит разделы:

- сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов;
- сигнализация в синапсе;
- сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
- действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации;
- сигнализация в растительных клетках и у прокариот;
- особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках;
- новые подходы и методы клеточных исследований.

УДК 576.3  
ББК 28.05

ISBN 978-5-6049994-2-4 (Т. 2)  
ISBN 978-5-6049994-0-0

© Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2023

## СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ИОННЫХ КАНАЛОВ И РЕЦЕПТОРОВ

### АНГИОТЕНЗИН-II РЕГУЛИРУЕТ ГИПОКСИЧЕСКУЮ ВАЗОКОНСТРИКЦИЮ В КРОВЕНОСНОМ РУСЛЕ ЛЁГКИХ У КРЫС С МОНОКРОТАЛИНОВОЙ ЛЁГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

*Абрамов А.А., Просвирнин А.В., Лакомкин В.Л., Кузьмин В.С.*

ФГБУ «НМИЦ Кардиологии им. Академика Чазова» МЗ РФ,  
Москва, Россия

**Введение.** Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) является достаточно распространенным заболеванием, которое сопровождается изменениями в сосудистом русле малого круга кровообращения, приводящими к росту правожелудочкового систолического давления, гипертрофии правого желудочка, увеличению легочного сосудистого сопротивления, нарушению циркуляции и оксигенации крови в малом круге кровообращения. Развитие ЛАГ сопровождается нарастанием т.н. «нейрогуморального дисбаланса», выражающегося в паталогической активации симпатической нервной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) [1]. В сосудах лёгких, полученных от больных ЛАГ, обнаруживается повышенный уровень ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и основного рецептора к АТ-II – AT1R, сигналинг через который стимулирует эффекты АТ-II: вазоконстрикцию, пролиферацию и ремоделирование сосудистой стенки. Одним из основных медиаторов эффектов АТ-II выступает НАДН-оксидаза (NOX), которая при активации сигнального пути AT1R/c-src приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК) [2-3]. Гипоксическая вазоконстрикторная реакция (ГВР) является отличительной особенностью сосудов малого круга кровообращения, в то время как для резистивных сосудов большого круга кровообращения (почечных, кишечных, мозговых артерий) характерной реакцией на гипоксию является дилатация [4]. Этот феномен известен с первой половины XX века, но лишь недавно были раскрыты его механизмы. [5]. Установлено, что в роли кислородного сенсора гладкомышечных клеток (ГМК) артерий лёгких выступает НАДН-дегидрогеназа железо-серный белок 2(Ndufs2), локализованный с комплексом I митохондриальной электронно-транспортной цепи. Индикатором гипоксии выступает цитоплазматический пул АФК, который пополняется как в результате работы митохондрий, так и в результате работы мембранных NOX. Гипоксия приводит к снижению количества АФК, что в свою очередь меняет окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы ГМК, приводит к



восстановлению тиоловых групп и разрушению дисульфидных связей в цитоплазматических доменах молекул ряда потенциалуправляемых ионных  $K^+$ -каналов (Kv). Разрушение дисульфидных связей сопровождается закрытием калиевых каналов [6], деполяризацией мембраны, открытию потенциалчувствительных  $Ca^{2+}$ -каналов, поступлению  $Ca^{2+}$  в цитоплазму и сокращению клетки.

Таким образом, АТ-II, активируя NOX, может прямо влиять на протекание ГВР за счёт увеличения цитоплазматического пула АФК. Остается неизвестным, каковы могут быть физиологические эффекты изменения баланса АФК, наблюдаемого при ЛАГ в результате повышении уровня АТ-II в стенке артерий малого круга.

В связи с вышесказанным в данной работе была поставлена цель – исследовать влияние АТ-II на выраженность ГВР у крыс с моделированной ЛАГ в ответ на транзиторную гипоксию на разных сроках патологии.

**Методика.** В экспериментах использовали половозрелых самцов стока Wistar (250-300 г, 10 недель). ЛАГ моделировали путём подкожной инъекции монокроталина (МКТ) в дозе 60 мг/кг, которая позволяет сформировать ЛАГ в течение четырёх недель. Интенсивность ГВР определяли перед инъекцией МКТ, а затем на вторую и четвёртую недели после введения МКТ. ГВР оценивали в контрольных условиях, а также на фоне инфузии АТ-II в дозе 1.2 нг/кг/мин (Harvard Apparatus Pump 11 Elite). Интенсивность ГВР определяли по уменьшению конечно-диастолического объёма (КДО), который определялся эхокардиографически (Vevo 1100 VisualSonic) с помощью линейного датчика MS250 с рабочей частотой 12 МГц при левостороннем парастернальном доступе к сердцу. Для оценки ГВР у наркотизированных (Золетил 100, 0.1 мл/100 г) животных, с предварительно установленным в хвостовую вену кубитальным катетером (22G) перед началом пробы определялся КДО при естественном дыхании, а затем в течение минуты животному, через ингаляционную маску, со скоростью 250-300 мл/мин подавали воздушную смесь с 10% содержанием  $O_2$ . В начале и в конце периода подачи гипоксической смеси, а также через 1 мин после окончания транзиторной гипоксии определяли КДО. Аналогичную процедуру осуществлял фоне инфузии АТ-II через 10 мин.

В силу того, что данное исследование – хроническое, для измерения интенсивности ГВР был использован КДО, а не сопротивление лёгочных сосудов. Несмотря на то, что сосудистое сопротивление является более прямым показателем, чем КДО, последний служит индикатором быстрых изменений сосудистого тонуса.

У части крыс со сформированной ЛАГ осуществляли катетеризацию левого желудочка сердца для прямого определения КДО и его изменений на фоне ГВР методом внутривентрикулярной тетраполярной

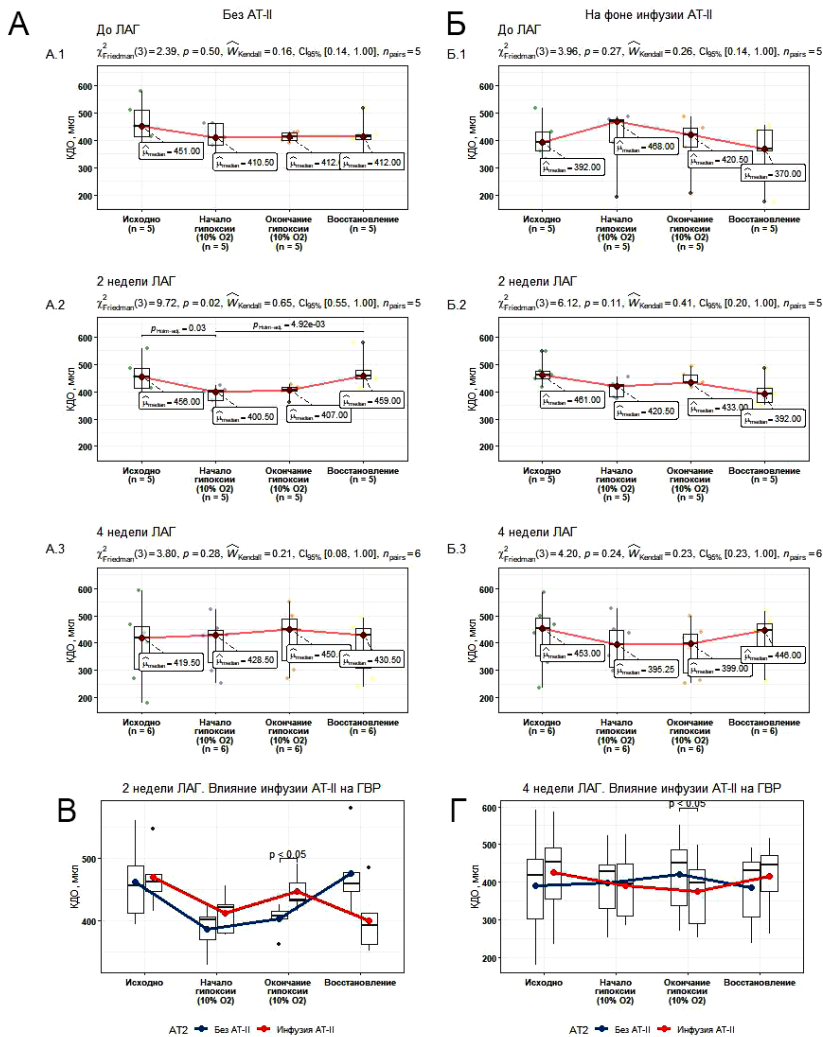
импедансографии. Катетеризацию осуществляли под наркозом (Золетил 100, 0.1 мл/100 г) стандартным способом через правую наружную сонную артерию. Регистрацию производили с помощью блока предобработки сигналов давления и объёма Transonic ADVantage 500 и АЦП ADInstruments PowerLab 16/35. Запись и обработку данных осуществляли с помощью программы LabChart 8.1.2.

Статистическая обработка и визуализация производилась в среде R 4.2.1. Статистически значимые различия между группами выявляли при помощи теста Фридмана (непараметрический вариант дисперсионного анализа для связанных измерений) с применением апостериорных тестов Дурбина-Коновера и внесением поправки на множественное тестирование по Холму. Различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представлены, как медиана  $\pm$  абсолютное отклонение медианы.

**Результаты.** В контрольных условиях и при действии АТ-II динамика КДО у здоровых крыс оказывается различной.

У здоровых крыс в начальный момент транзиторной гипоксии КДО снижается на 10% от исходного уровня (с  $451 \pm 87.5$  до  $407.8 \pm 83.3$  мкл); по окончании транзиторной гипоксии спустя 1 мин нормоксии восстановления не происходит – КДО остаётся на уровне  $412 \pm 14.8$  мкл, что составляет 91% от его исходных значений (рис. 1). В начальный момент транзиторной гипоксии на фоне АТ-II у здоровых животных наблюдается резкое увеличение КДО (от  $392 \pm 56.3$  до  $465.2 \pm 30.1$  мкл) - на 19% от исходного уровня. К концу гипоксического теста КДО уменьшается от  $465.2 \pm 30.1$  мкл до  $415.5 \pm 61$  мкл, но всё ещё остаётся на 6% выше контрольного значения. По окончании транзиторной гипоксии спустя 1 мин нормоксии на фоне АТ-II КДО снижается до  $370 \pm 99.3$  мкл, что на 5% ниже контрольного уровня (рис. 1Б.1). Таким образом, у здоровых крыс транзиторная гипоксия вызывает снижение КДО; на фоне АТ-II КДО не реагирует снижением в ответ на транзиторную гипоксию.

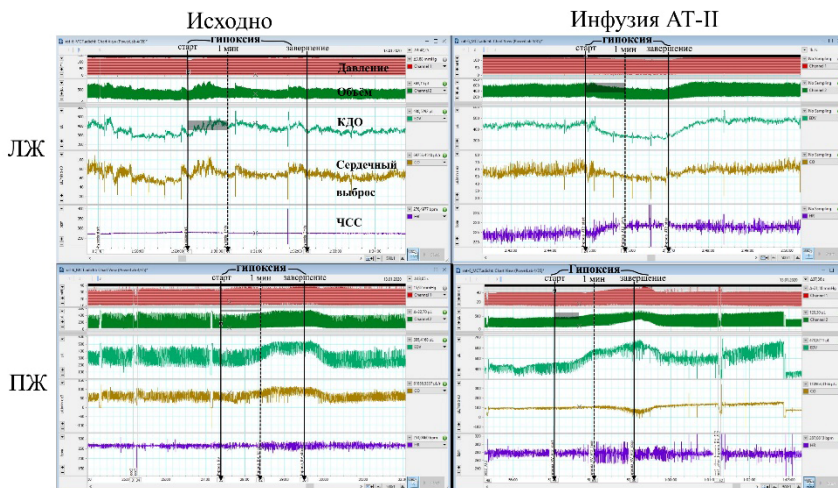
Транзиторная гипоксия вызывает различные изменения КДО у здоровых крыс и крыс с ЛАГ на разных стадиях после инъекции МКТ. На вторую неделю после индукции ЛАГ падение КДО в начальный момент гипоксического теста оказывается более выраженным - от  $456 \pm 65.2$  до  $396.7 \pm 31.9$  мкл;  $p = 0.03 < 0.05$ ) и составляет 13% (рис. 1А.2). К моменту окончания гипоксического теста КДО увеличивается до  $404.5 \pm 20$  мкл, а через минуту нормоксии возвращается к исходному уровню, достигая  $459 \pm 26.7$  мкл ( $p = 0.0049$ ). В противоположность здоровым животным, на фоне АТ-II падение КДО у крыс с ЛАГ в ответ на гипоксию сохраняется, хоть и является менее выраженным: от  $461 \pm 22.2$  до  $416.3 \pm 50.7$  мкл (10% от исходного уровня) в начале транзиторной гипоксии (рис. 1Б.2). К моменту окончания гипоксического теста КДО составляет  $439.2 \pm 49.9$  мкл, а за минуту нормоксии КДО вновь снижается до  $392 \pm 44.5$  мкл (10% от исходного уровня).



**Рис. 1.** Реакция КДО на транзиторную гипоксию. Панель А – без АТ-II, панель Б – на фоне инфузии АТ-II. Номерами обозначены последовательные временные точки: А.1/Б.1 – исходно, до ЛАГ, А.2/Б.2 – 2 недели ЛАГ, А.3/Б.3 – 4 недели ЛАГ. Графики даны с одинаковым масштабом по оси у. В – влияние инфузии АТ-II на изменения КДО в ответ на транзиторную гипоксию на второй неделе ЛАГ. Г – влияние инфузии АТ-II на изменения КДО в ответ на транзиторную гипоксию на четвёртой неделе ЛАГ

Через 4 нед. после индукции ЛАГ у крыс в ответ на гипоксию наблюдается стабильный рост КДО – от  $419.5 \pm 147.5$  до  $426.6 \pm 81.4$  мкл вначале гипоксического теста. К моменту окончания транзиторной гипоксии КДО составлял  $458.5 \pm 125.8$  мкл (на 9% выше исходного уровня, рис. 1А.3). Спустя минуту нормоксии КДО снижается до  $430.5 \pm 64.5$  мкл.

На фоне АТ-II через 4 нед, как и спустя 2 нед после введения МКТ воспроизводятся реакция снижения КДО в ответ на гипоксию: от  $453 \pm 126$  мкл до  $393 \pm 113.4$  мкл в момент, соответствующий началу гипоксического теста, и  $407.3 \pm 84$  мкл в момент окончания гипоксии (рис. 1 Б.3). Более того, через минуту нормоксии КДО почти возвращается к исходным значениям ( $446 \pm 75.6$  мкл). Реакция КДО на транзиторную гипоксию на фоне инфузии АТ-II статистически значимо ( $p < 0.05$ ) снижена на момент окончания гипоксии для крыс на второй неделе ЛАГ (рис. 1В) и статистически значимо ( $p < 0.05$ ) увеличена для тех же крыс на четвёртой неделе ЛАГ (рис. 1Г). Таким образом, на четвёртую неделю ЛАГ у крыс исчезает реакция снижения КДО в ответ на транзиторную гипоксию, но на фоне инфузии АТ-II она частично восстанавливается.



**Рис. 2.** Репрезентативная запись давления и объёма в левом желудочке во время транзиторной гипоксии от крысы на четвёртой неделе ЛАГ без инфузии АТ-II и на её фоне. Пунктиром отмечена длительность транзиторной гипоксии в экспериментах с использованием эхокардиографии. КДО – конечно-диастолический объём. ЧСС – частота сердечных сокращений.

Влияние АТ-II на КДО у крыс через 4 нед после индукции ЛАГ подтверждаются при прямом измерении конечно-диастолического объема с помощью внутрижелудочковой катетеризации: с  $449 \pm 25.8$  мкл до

347 ± 37.1 мкл. На рис. 2 приведена репрезентативная запись прямой регистрации КДО при транзиторном гипоксическом тесте в контроле и на фоне АТ-II. Исходно, транзиторная гипоксия не сопровождается падением КДО, тогда как на фоне инфузии АТ-II это падение отчётливо.

**Обсуждение и выводы.** В наших экспериментах установлено, что зрелая ЛАГ (4 недели после инъекции МКТ) подавляет гипоксическую вазоконстрикторную реакцию в легочных артериях, в то время как у крыс с развивающейся ЛАГ (2 недели после инъекции МКТ) ГВР наоборот усиливается; более того у крыс с ЛАГ может измениться тип реакции сосудистого русла на гипоксию – через 4 нед. после инъекции МКТ наблюдается увеличение КДО при транзиторной гипоксии. В данной работе мы впервые продемонстрировали, что АТ-II подавляет ГВР у здоровых животных.

Как указано выше, АТ-II стимулирует генерацию АФК. Все сосудистые НАДФН-оксидазы, включая NOX1, NOX2, NOX4 и NOX5 находятся под тесным контролем АТ-II [7]. Регуляция происходит, как на уровне экспрессии – за счёт активации АТ-II экспрессии соответствующих генов [8], так и за счёт активации транслокации p47phox в кавеолы [9]. При осуществлении ГВР падение уровня цитоплазматического АФК является событием, передающим сигнал от кислородного сенсора к эффектору – K<sup>+</sup>-каналам плазмалеммы ГМК. При инфузии АТ-II включается независимый от митохондрий источник АФК, который продолжает работать во время гипоксии. Наши результаты для интактных крыс и для крыс на второй неделе ЛАГ с этим согласуются – инфузия АТ-II оказывает тормозящее, либо даже блокирующее влияние на ГВР.

Также с литературными данными согласуется усиление ГВР на вторую неделю ЛАГ [10]. К этому сроку в монокроталиновой модели ЛАГ происходит мускуляризация резистивных артерий третьего и четвёртого порядков.

В данной работе мы впервые установили, что эффект АТ-II изменяется при формировании ЛАГ, и у животных на 2 и 4 нед. после индукции ЛАГ действие ангиотензина оказывается инвертированным – АТ-II приводит к снижению КДО, что феноменологически может быть интерпретировано как восстановление способности артерий к ГВР. Данное наблюдение указывает на то, что в ходе формирования ЛАГ происходит не только структурное ремоделирование сосудистой стенки, но и комплексное изменение внутриклеточных сигнальных путей рецепторов ангиотензина, затрагивающих регуляцию NOX, продукцию АФК и, вероятно, механизмов редокс-чувствительности калиевых ионных каналов ГМК.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 22-15-00189).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Maron B.A., Leopold J.A., Hemnes A.R.* // Br. J. Pharmacol. 2020. 177(7): 1457-71.
2. *Maron B.A., Leopold J.A.* // Pulm. Circ. 2014. 4(2): 200-10.
3. *de Man F.S. et al.* // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012. 186(8): 780-9.
4. *Dunham-Snary K.J. et al.* // Chest. 2017. 151(1): 181-92.
5. *Dunham-Snary K.J. et al.* // Circ. Res. 2019. 124(12): 1727-46.
6. *Dasgupta A. et al.* // Compr. Physiol. 2020. 10(2): 713-65.
7. *Nguyen Dinh Cat A. et al.* // Antioxid. Redox. Signal. 2013. 19(10): 1110-20.
8. *Forrester S.J. et al.* // Physiol Rev. 2018. 98(3): 1627-738.
9. *Soe N.N. et al.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2013. 33(9): 2147-53.
10. *Rosenberg H. C., Rabinovitch M.* // Am. J. Physiol. 1988. 255(6): H1484-91.

### ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫМ ВХОДОМ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ НЕК293

*Григорьева Е.Р., Номеровская М.А., Решетин Д.С., Колесников Д.О.,  
Глушанкова Л.Н., Казначеева Е.В., Шалыгин А.В.*

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Кальций-активируемые хлорные каналы (CaCC) играют роль во многих физиологических процессах, широко представлены в разных тканях. Они необходимы для секреции многих экзокринных желез. Активность этих каналов играет роль в регуляции работы гладкой, скелетной и сердечной мускулатуры, в регуляции работы нервной системы, также каналы задействованы в других физиологических процессах. Таким образом, CaCC участвуют в регуляции многих внутриклеточных процессов, происходящих в организме человека.

Среди каналов CaCC выделяют семейство ANO, состоящее из десяти белков, которые называются TMEM16A-TMEM16K или ANO1-ANO10. ANO6 (TMEM16F) является наиболее необычным каналом данного семейства. Он совмещает функции скрамблазы и канала, очень важен для работы тромбоцитов, так как переносит фосфатидилсерин (PS) на наружный слой плазматической мембраны. PS служит посадочной платформой для факторов свертываемости крови. Также, TMEM16F участвует в минерализации костей и восстановлении плазматической мембраны, регулирует возбудимость нейронов. Мутация ANO6,

вызывающая укорочение белка, приводит к нарушению свёртываемости крови – синдрому Скотта [1]. Показана роль ANO6 в регуляции и других физиологических процессов.

Для активации ANO6 требуется относительно высокая локальная концентрация внутриклеточного кальция. До конца не ясно, как она достигается. Одним из основных путей повышения внутриклеточной концентрации кальция в электроневозбудимых клетках является депо-управляемый вход. Когда снижается концентрация ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме, происходит изменение конформации сенсоров STIM, расположенных на мембране ретикулума. Вслед за этим сенсоры STIM перемещаются к плазматической мембране, где активируют депо-управляемые каналы Orai и TRPC. Далее поступление ионов кальция через депо-управляемые каналы в цитоплазму приводит к активации факторов транскрипции генов, внутриклеточных сигнальных каскадов, различных кальций-зависимых каналов, в том числе и каналов CaCC семейства анактоминов. Ток через кальций-зависимые каналы влияет на сигнальные каскады и распространение кальциевого сигнала.[2].

В ряде работ было показано, что активность каналов CaCC в некоторых тканях может зависеть от опустошения депо. Так, для активации ANO1 в ноцицептивных нейронах необходим выброс кальция из депо через IP<sub>3</sub> рецепторы [3]. В слюнных железах активность каналов CaCC зависит от входа кальция через TRPC1 [4]. В некоторых работах было показано, что активность ANO зависела от входа кальция через депо-управляемые каналы Orai [5]. Пути активации каналов ANO6 изучено недостаточно, в основном опираясь на косвенные данные и системы с оверэкспрессией. Нарушение работы депо-управляемых каналов и ANO6 приводит к формированию сходных патологий. Можно предположить, что вход кальция через депо-управляемые каналы участвует в активации ANO6.

Ранее в нашей лаборатории были описаны токи через эндогенные CaCC в клетках HEK293. Каналы характеризовались выходящим выпрямлением вольт-амперной кривой. Каналы активировались на положительном потенциале с задержкой. Проводимость и вероятность открытого состояния увеличивалась при деполяризации мембраны и повышении внутриклеточной концентрации кальция. CaCC активируются Ca<sup>2+</sup>, но не активируется Ba<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup>. Такие же свойства характерны для ANO6 [6].

Целью работы было изучить молекулярный состав эндогенных CaCC в клетках HEK293 и регуляцию их активности депо-управляемым входом кальция.

**Материалы и методы.** Мы регистрировали токи через отдельные ионные каналы методом локальной фиксации потенциала. Регистрация токов через отдельные каналы позволяет разделить активность разных каналов в одном эксперименте и оценить их электрофизиологические свойства, недоступные при измерении интегральных токов через мембрану. Использовались конфигурации cell-attached, которая дает возможность оценивать активность кальций-активируемых хлорных каналов в физиологических условиях, и inside-out, позволяющая контролировать концентрацию ионов во внутриклеточной среде.

Для работы использовались клетки линии HEK293. Клетки культивировались на среде DMEM с добавлением 10% сыворотки, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% L-глутамина. Трансфекцию клеток проводили по достижению 40-60% плотности через 16-24 часов после посева. Для трансфекции использовали катионный трансфицирующий агент PEI. Клетки с экспрессией Orail E016Q использовали через 16-36 часов после трансфекции. Клетки с shRNA использовали через 36-48 часа после трансфекции.

**Результаты и обсуждение.** *Селективный ингибитор CaCC CaCCinhA01 снижает активность эндогенных CaCC в клетках HEK293.* Известно, что селективный ингибитор CaCCinhA01 подавляет активность эндогенных CaCC [7]. Однако, неизвестно на какое именно свойство эндогенных каналов он влияет. Мы измерили активность эндогенных CaCC методом локальной фиксации потенциала в конфигурации inside-out и показали, что приложение блокатора с внутриклеточной стороны приводит к снижению времени открытого состояния эндогенных CaCC. Таким образом, исследуемые нами каналы относятся к группе аноктаминов.

*Нокдаун по гену ANO6 снижает активность эндогенных CaCC в клетках HEK293.* Мы измеряли активность эндогенных CaCC с гиперэкспрессией shRNA против гена ANO6 в конфигурации inside-out. Активность эндогенных CaCC вызывали приложением раствора с 10 мкМ свободных ионов кальция к внутриклеточной стороне мембраны. Наблюдали, что в контрольных клетках эндогенные CaCC активировались, в то время как в клетках с гиперэкспрессией shRNA против ANO6 их активность была подавлена на 80%. Следовательно, ANO6 участвует в образовании проводящей поры эндогенных CaCC.

*Опустошение кальциевого депо приводит к активации эндогенных CaCC в клетках HEK293.* Мы измеряли активность эндогенных CaCC в конфигурации cell-attached при опустошении депо тапсигаргином. Тапсигаргин является селективным блокатором Ca<sup>2+</sup> АТФазы эндоплазматического ретикула. При его воздействии кальций



вытекает по градиенту концентрации из депо, что приводит к активации депо-управляемых каналов. После приложения тапсигаргина, мы наблюдали активность эндогенных депо-управляемых каналов TRPC1. При этом, на положительных потенциалах мы наблюдали эндогенные ANO6. Исходя из этого, мы заключили, что опустошение кальциевого депо приводит к активации эндогенных каналов ANO6.

**Приложение С-концевого фрагмента сенсора STIM1 L251S приводит к активации эндогенных CaCC в клетках HEK293.** Для ANO6 механизм активации изучен недостаточно. Есть работы, которые говорят о колокализации эндогенных каналов CaCC и депо-управляемых каналов. Для того чтобы разнести процессы выброса кальция из депо и депо-управляемого входа кальция, мы работали в конфигурации inside-out, активируя депо-управляемые каналы приложением С-концевого фрагмента белка STIM1 – основного активатора депо-управляемых каналов, с конститутивно-активной мутацией L251S. В конфигурации inside-out мы прикладывали 1 мкМ С-концевого фрагмента сенсора STIM1 L251S к цитоплазматической стороне мембраны. При этом наблюдали, что на отрицательных потенциалах активируются депо-управляемые каналы TRPC1, на положительных потенциалах –эндогенные CaCC. Также мы использовали доминантно-негативные белки Orai, которые несут мутацию к поре канала, при этом нарушается проводимость эндогенных каналов Orai и подавляется депо-управляемый вход. Мы обнаружили, что сверхэкспрессия Orai1 E106Q отменяет активацию депо-управляемых каналов TRPC1 и уменьшает вероятность открытого состояния эндогенных CaCC. Таким образом, мы показали, что активность эндогенных CaCC ANO6 зависит от входа кальция через депо-управляемые каналы.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 22-24-00761 (Колесников Д.О., Номеровская М.А.) и № 23-44-00054 (Григорьева Е.Р., Решетин Д.С., Казначеева Е.В.).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kalienkova V., Clerico Mosina V., Paulino C. // J. Mol. Biol. 2021. 433(16): 166941.
2. Bakowski D., Murray F., Parekh A.B. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2021. 61(1): 629-54.
3. Jin X., Shah S., Liu Y. et al. // Sci. Signal. 2013. 6(290): ra73.
4. Sun Y., Birnbaumer L., Singh B.B. // J. Cell. Physiol. 2015. 230(11): 2848-56.
5. Cabrita I., Benedetto R., Fonseca, A. et al. // FASEB J. 2017. 31(5): 2123-34.
6. Kolesnikov D., Perevostnikova A., Gusev K. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(9): 4767.
7. Martinsa J.R., Fariaa D., Kongsuphola P. et al. // PNAS. 2011. 108(44): 18168-72.

# КАЛИЕВЫЙ ТОК ВХОДЯЩЕГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ УЧАСТВУЕТ В ПРОАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА ПОЛЫХ ВЕН, ВЫЗВАННОЙ АЛЬФА-АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ

*Иванова А.Д.<sup>1</sup>, Филатова Т.С.<sup>1</sup>, Абрамочкин Д.В.<sup>1</sup>,  
Пустовит О.Б.<sup>1</sup>, Кузьмин В.С.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория электрофизиологии сердца, Национальный медицинский  
исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова,  
Москва, Россия

**Введение.** У большинства млекопитающих кардиомиоциты могут быть обнаружены за пределами камер сердца в составе стенок торакальных (т.е. полых и легочных) вен [1,2]. Миокардиальная обкладка торакальных вен электрически активна, способна генерировать потенциалы действия (ПД) и проводить возбуждение [3,4]. В последние два десятилетия миокард торакальных вен является объектом активных исследований как важный источник эктопической активности, провоцирующей фибрилляцию предсердий (ФП). Заметная доля клинических случаев связана с эктопической активностью в миокардиальной обкладке полых вен [5,6] – однако, по сравнению с легочными венами миокард полых вен до сих пор изучен слабо. Известно, что автономная регуляция играет важнейшую роль в развитии аритмий, связанных с миокардом полых вен, – показано, что адренергическая стимуляция усиливает эктопическую активность, проаритмическую автоматию и триггерную активность в миокарде полых вен грызунов и других видов млекопитающих [7]. Сходные проаритмические изменения биоэлектрической активности, вызванные адренергической стимуляцией, показаны для миокарда полых вен [8]. Известно, что в миокарде легочных вен для манифестации симпатических проаритмических эффектов необходима активация как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -адренорецепторов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -АР); при этом предполагается, что активация  $\alpha$ 1-АР оказывает перmissive эффект [9,10]. Показано, что  $\alpha$ 1-адренергическая стимуляция провоцирует ФП [11] и усиливает спонтанную активность в кардиомиоцитах нижней полой вены [12] – однако, механизмы эффектов  $\alpha$ 1-адренергической стимуляции в полых венах остаются неизвестными. Целью данной работы было изучение клеточных и ионных механизмов, лежащих в основе эффектов  $\alpha$ -адренергической стимуляции в миокарде полых вен на примере нижней полой вены (НПВ) крысы.

**Результаты.** Иммуногистохимическое окрашивание продемонстрировало наличие  $\alpha$ 1-АР в миокардиальной обкладке НПВ крысы. Во всех исследованных препаратах были видны

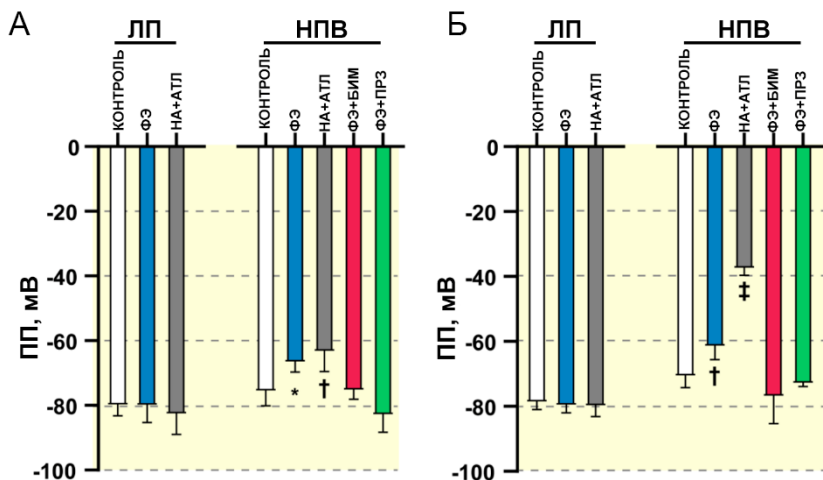
флюоресцирующие кластеры, что соответствует данным о локализации  $\alpha 1$ -АР в кавеолах [13]. Площадь флюоресценции в результате окрашивания на  $\alpha 1$ -АР в НПВ ( $3.6 \pm 0.8$ ,  $n = 5$ ) не отличалась от площади флюоресценции после аналогичного окрашивания препаратов левого ( $5.03 \pm 1.3\%$ ,  $n = 5$ ) и правого предсердия ( $4.9 \pm 0.3\%$ ,  $n = 5$ ) – то есть, плотность  $\alpha 1$ -АР в этих типах миокарда не различается.

Оптическое картирование электрической активности в препаратах НПВ крысы с использованием потенциалчувствительного красителя di-4-ANNEPS показало, что в контрольных условиях при постоянной электрической стимуляции (длительность цикла 100-250 мс) миокард НПВ способен проводить электрическое возбуждение в антероградном направлении без блоков проведения. Скорость проведения возбуждения в проксимальной и дистальной областях составила, соответственно,  $56 \pm 17$  и  $53 \pm 11$  см/с – что несколько ниже, чем в рабочем миокарде левого предсердия ( $70 \pm 12$  см/с). При воздействии  $\alpha 1$ -адреномиметика фенилэфрина (ФЭ) в концентрации 10 мкМ в миокарде НПВ наблюдалось замедление проведения возбуждения (до  $17.6 \pm 6.4$ ,  $19.2 \pm 8.6$  и  $22 \pm 10.3$  см/с при длине цикла 100, 150 и 250 мс, соответственно). В препаратах левого предсердия, однако, скорость проведения под действием ФЭ не менялась. Замедление проведения возбуждения в миокарде НПВ ведет к укорочению волны возбуждения, что в свою очередь создает благоприятные условия для формирования *re-entry* и может спровоцировать ФП.

Зарегистрированный с помощью острых стеклянных микроэлектродов потенциал покоя (ПП) в миокардиальной обкладке НПВ был в контрольных условиях близок к уровню ПП в левом предсердии:  $-75.9 \pm 4$  мВ ( $n = 6$ ) и  $-80.3 \pm 5$  мВ ( $n = 20$ ), соответственно. Однако, в миокарде НПВ уровень ПП зависел от паттерна электрической активности: прекращение стимуляции приводило к быстрому (<1 мин) и статистически значимому сдвигу ПП до  $-71.0 \pm 3$  мВ ( $p = 0.0015$ ,  $n = 6$ ,

t-тест для связанных выборок). При аппликации ФЭ (10 мкМ) наблюдали статистически значимую деполяризацию – как в отсутствие электрической стимуляции, так и в стимулируемых препаратах (рис. 1А, Б). Сходные эффекты наблюдались при аппликации норадреналина (НА, 10 мкМ) в условиях блокады  $\beta$ -адренорецепторов атенололом (АТЛ, 10 мкМ). Напротив, в условиях блокады  $\alpha 1$ -АР празозином (ПРЗ, 10 мкМ) ФЭ не вызывал изменений в уровне МП в препаратах НПВ. Также в условиях ингибирования протеинкиназы С (ПКС) бисиндолилмалеимидом I (БИМ, 0.1 мкМ) ФЭ не изменял ПП в миокарде НПВ. В препаратах левого предсердия ни ФЭ, ни норадреналин в условиях  $\beta$ -блокады не вызывали изменения уровня МП. Сдвиг уровня МП при  $\alpha 1$ -адренергической стимуляции может быть связан с влиянием сигнального каскада, запускаемого  $\alpha 1$ -АР, на каналы входящего выпрямления ( $K_{ir}$ ), играющие ключевую роль в поддержании ПП в

клетках миокарда. Деполаризация при активации  $\alpha 1$ -АР может приводить к инактивации значительной части каналов  $Na_v1.5$  и снижению амплитуды переносимого ими быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  – что, в свою очередь, может быть причиной наблюдаемого снижения скорости распространения возбуждения в препаратах НПВ.



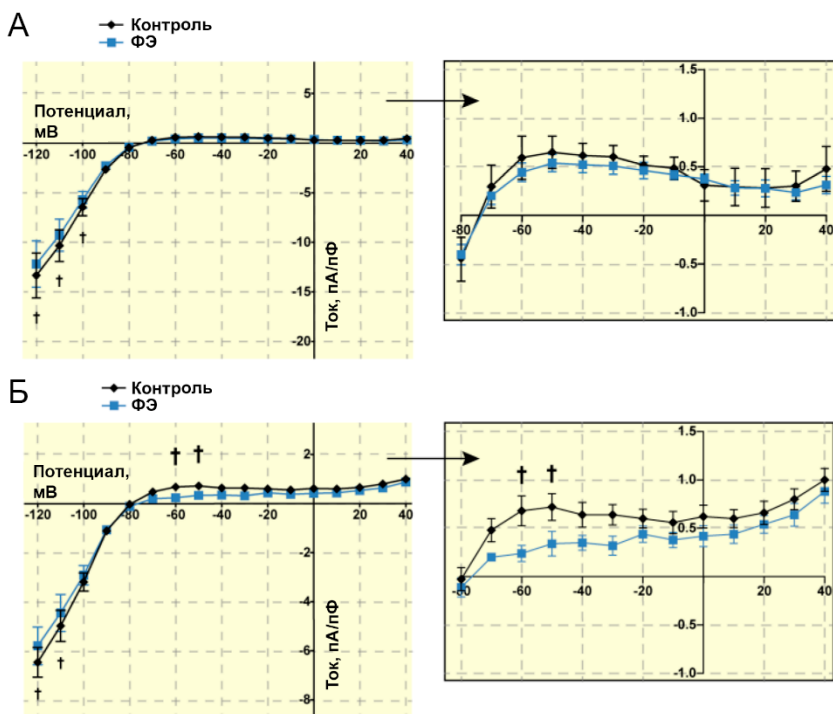
**Рис. 1.** Уровень ПП в электрически неактивных (А) и стимулируемых (Б) препаратах левого предсердия (ЛП) и НПВ крысы в контроле, в условиях  $\alpha 1$ -адренергической активации (ФЭ, НА+АТЛ) и при блокаде  $\alpha 1$ -АР (ФЭ+ПРЗ) или ПКС (ФЭ+БИМ). \* –  $p < 0.05$ , † –  $p < 0.001$ , †† –  $p < 0.0001$ , по сравнению с контрольными значениями, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA).

Это предположение подтверждается изменением конфигурации ПД при  $\alpha 1$ -адренергической активации. В контрольных условиях ПД, зарегистрированные с помощью стандартной микроэлектродной техники в препаратах левого предсердия и в миокарде НПВ, имеют сходную форму; максимальная скорость нарастания переднего фронта в препаратах НПВ ( $160.1 \pm 33.9$  В/с,  $n = 7$ ) была близка к таковой в предсердном миокарде ( $180.7 \pm 29.9$  В/с,  $n = 20$ ); длительность ПД на уровне 90% реполяризации (ДПД90) в препаратах НПВ была несколько выше ( $40.3 \pm 5.3$  мс,  $n = 6$ ), чем в предсердных препаратах ( $28.5 \pm 2.5$  мс,  $n = 6$ ,  $p = 0.0149$ ). В присутствии 10 мкМ ФЭ или НА+АТЛ в препаратах НПВ, но не в предсердном миокарде происходило значительное увеличение ДПД90: на  $30.1 \pm 7.1\%$  ( $p = 0.0045$ ,  $n = 6$ ) и  $63.3 \pm 10.1\%$  ( $p < 0.0001$ ,  $n = 5$ ), соответственно. В условиях блокады  $\alpha 1$ -АР (ПРЗ, 10 мкМ) или ПКС (БИМ, 0.1 мкМ) ФЭ не вызывал удлинения ПД. Поскольку ток, опосредуемый каналами входящего выпрямления, может участвовать не только в

поддержании ПП, но и в окончательной реполяризации в ходе генерации ПД, увеличение ДПД90 согласуется с гипотезой о возможном влиянии  $\alpha 1$ -адренергической активации на  $K_{ir}$ .

Помимо этого, ФЭ вызывал достоверное снижение скорости нарастания переднего фронта в препаратах НПВ, но не в левом предсердии на  $26.3 \pm 7.9\%$  ( $n = 6$ ,  $p = 0.0269$ ). В присутствии ПРЗ или БИМ этот эффект не наблюдался. Это также согласуется с предположением о том, что сдвиг ПП, вызванный активацией  $\alpha 1$ -АР, приводит к инактивации каналов тока  $I_{Na}$ , что снижает скорость деполяризации при генерации ПД.

Для проверки гипотезы о возможной роли тока входящего выпрямления в реализации эффектов  $\alpha 1$ -адренергической активации в миокарде НПВ мы провели эксперименты с регистрацией ионного тока методом пэтч-кламп в энзиматически изолированных кардиомиоцитах.



**Рис. 2.** Фоновый ток входящего выпрямления  $K_{ir}$  в кардиомиоцитах из левого предсердия (А) и НПВ (Б) в контроле и в присутствии 10 мкМ ФЭ. † –  $p < 0.01$ , по сравнению с контрольными значениями, двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA).

Поскольку в норме в отсутствие дополнительной фармакологической стимуляции ацетилхолинзависимый ток  $I_{K_{ACH}}$  и АТФ-зависимый ток  $I_{K_{ATP}}$  не участвуют в электрической активности миокарда, считали, что чувствительная к  $BaCl_2$  (1 мМ) компонента интегрального тока соответствует фоновому току входящего выпрямления  $I_{K1}$  [14]. В контрольных условиях ток  $I_{K1}$  (по меньшей мере, его входящая компонента при  $-120$  мВ) в кардиомиоцитах из НПВ был меньше ( $-7.9 \pm 1.3$  пА/пФ,  $n = 9$ ), чем  $I_{K1}$  в кардиомиоцитах, выделенных из левого предсердия ( $-13.2 \pm 1.4$  пА/пФ,  $n = 10$ ;  $p < 0.0001$ ). ФЭ (10 мкМ) слабо снижал амплитуду входящей компоненты  $I_{K1}$  в предсердных кардиомиоцитах, но не влиял на его выходящую компоненту, соответствующую реполяризующему току (рис. 2А). В кардиомиоцитах, выделенных из НПВ, ФЭ подавлял как входящую, так и выходящую компоненты  $I_{K1}$  (рис. 2Б). Таким образом, ток  $I_{K1}$  меньше выражен в миокардиальной обкладке НПВ и более чувствителен к ФЭ, что может быть причиной нестабильности МП миокарда НПВ, в особенности в условиях адренергической стимуляции.

Ток  $I_{K1}$  опосредуется каналами Kir2.1, Kir2.2 и Kir2.3. Используя метод ПЦР в реальном времени, а также вестерн-блоттинг, мы оценили экспрессию мРНК и белков канальных субъединиц канальных изоформ, переносящих  $I_{K1}$ . Доминирующей изоформой в миокарде НПВ и левого предсердия, как по уровню мРНК, так и по количеству белка, была Kir2.1, самый низкий уровень был показан для Kir2.3; уровни экспрессии этих изоформ не различались между предсердием и миокардом НПВ. Однако, для миокарда НПВ был характерен сниженный уровень экспрессии Kir2.2, как на уровне мРНК, так и на белковом уровне. Предположительно, это может быть причиной сниженного тока  $I_{K1}$  в миокарде торакальных вен и лежать в основе их проаритмической активности. Различная чувствительность тока  $I_{K1}$  к  $\alpha 1$ -адренергической стимуляции в миокарде предсердий и НПВ, показанная в данной работе, может быть теоретически объяснена различиями гомо-/гетеромерной сборки каналов в этих типах миокарда.

**Закключение.** В работе было показано, что  $\alpha 1$ -адренергическая стимуляция нарушает проведение возбуждения в миокардиальной обкладке НПВ крысы, создавая субстрат для развития аритмических событий. В основе этого лежит деполяризация миокарда НПВ и изменение конфигурации его электрической активности, вызванные подавлением фонового тока входящего выпрямления  $I_{K1}$ . Эффекты активации  $\alpha 1$ -АР в миокарде НПВ предположительно опосредуются сигнальным каскадом, включающим протеинкиназу С.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hashizume H., Ushiki T., Abe K. // Arch. Histol. Cytol. 1995. 58: 457-64.
2. Carrow R., Calhoun M.L. // Anat. Rec. 1964. 150(3): 249-56.
3. Spach M.S., Barr R.C., Jewett P.H. // Am. J. Cardiol. 1972. 30(8): 844-54.
4. Cheung D.W. // J. Physiol. 1981. 314(1): 445-56.
5. Sugimura S., Kurita T., Kaitani K. et al. // Heart Vessels. 2016. 31(9): 1562-9.
6. Mansour M., Ruskin J., Keane D. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. 2002. 13(12): 1292-5.
7. Iwasaki Y.K., Nishida K., Kato T., Nattel S. // Circulation. 2011. 124(20): 2264-74.
8. Arita M., Saeiki K., Tanoue M. et al. // Jpn. J. Physiol. 1967. 17(2): 158-73.
9. Maupoil V., Bronquard C., Freslon J.L. et al. // Br. J. Pharmacol. 2007. 150(7): 899-905.
10. Tsuneoka Y., Irie M., Tanaka Y. et al. // J. Pharmacol. Sci. 2017. 133(4): 195-202.
11. Tai C.T., Chiou C.W., Wen Z.C. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2000. 36(3): 788-93.
12. Chen Y.J., Chen Y.C., Yeh H.I. et al. // Circulation. 2002. 105(22): 2679-85.
13. Gallego M., Alday A., Alonso H., Casis O. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2014. 1838(2): 692-9.
14. Hibino H., Inanobe A., Furutani K. et al. // Physiol. Rev. 2010. 90(1): 291-366.

## ВЛИЯНИЕ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ НА ОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ

*Коровина М.О.<sup>1,2</sup>, Филина Ю.В.<sup>1</sup>, Сафронова В.Г.<sup>3</sup>,  
Хаертынов К.С.<sup>2</sup>, Габдулхакова А.Г.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, Россия

<sup>2</sup>КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,  
Казань, Россия

<sup>3</sup>ИБК РАН, Пущино, Россия

**Введение.** Нейтрофилы экспрессируют множество рецепторов для распознавания патогена и активации последующих реакций для уничтожения инфицирующего агента. К таким рецепторам относятся сцепленные с G-белком рецепторы формилированных пептидов, рецепторы фактора активации тромбоцитов, рецепторы компонента комплемента 5a и рецепторы хемокинов, которые регулируют миграцию и реализацию защитных функций клеток. Фагоцитоз зависит от активации Fc-рецепторов (FcR) и рецепторов комплемента, которые инициируют поглощение и уничтожение опсонизированных частиц, вирусов и бактерий. Рецепторы распознавания образов (PRRs), включая Toll-подобные рецепторы (TLRs), рецепторы лектина С-типа. (CLRs), рецепторы-мусорщики (SRs) и NOD-подобные рецепторы (NLRs) распознают структурно консервативные фрагменты микроорганизмов и

способствуют захвату частиц, а также активируют сигнальные каскады, регулирующие иммунные и воспалительные реакции [1-3].

Однако, в некоторых случаях нейтрофилы фагоцитируют, но не убивают бактерии и могут выступать в роли «тройного коня», экранируя бактерии от более эффективных защитных действий макрофагов [4,5]. Такое явление наблюдается при туберкулезе, который является одним из самых распространенных смертельных инфекционных заболеваний. Механизмы, за счет которых микобактерии ингибируют иммунные клетки, тесно связаны с модуляцией оксидазной функции клеток: продукция антиоксидантов, таких как KatG, позволяет обезвреживать активные формы кислорода (АФК), а комплекс белков SodA, DoxX и SseA, уменьшает окислительное повреждение, поддерживая тиоловый гомеостаз [6]. В то же время было обнаружено, что микобактериальная инфекция приводит к появлению в периферической крови больных туберкулезом популяции гранулоцитов низкой плотности, которые склонны к усиленной спонтанной продукции АФК и выбросу нуклеотидных внеклеточных ловушек [7]. Было высказано предположение, что микобактерии активируют гиперпродукцию АФК нейтрофилами, провоцируя некроз иммунных клеток, что способствует снижению противомикробной защиты [8].

Таким образом, остается не совсем ясным, каким образом микобактерии могут модулировать оксидазную активность нейтрофилов. Целью нашей работы была оценка влияния серологически активных антигенов лизатов микобактерии *M. bovis* на оксидазную активность нейтрофилов, вызванную различными стимулами.

**Материалы и методы.** Гранулоциты выделяли из костного мозга мышей-самцов линии BALB/c возрастом 8-12 недель и весом 20-25 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Исследования на животных одобрены протоколами № 12306 (2006) и № 2019/5 (2011) ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия). Выделение клеток из костного мозга мыши проводили методом центрифугирования в градиенте плотности перколла 55%, 62.5%, 78%, (v/v) при 10°C [9]. Жизнеспособность клеток определяли по окраске трипановым синим. Для экспериментов использовали выделенные клетки с жизнеспособностью и долей зрелых гранулоцитов не менее 95% (КМ-гранулоциты).

Клетки *M. bovis* Bovinus-8, штамм 700201 культивировали с использованием твердой среды Lowenstein-Jensen в течение 28-30 дней при 37°C, затем разрушали при помощи гомогенизатора FastPrep-24 с использованием Lysing MatrixB (MP Biomedicals). Осветленные гомогенаты разделяли с помощью электрофореза в 12.5% в ПААГ в денатурирующих условиях, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения иммуноблота. Для определения серологической активности использовали гипериммунную сыворотку кролика из



коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань). Антигены 5 и 6 (2.8-3 кДа) являются синтетическими полипептидами, подобными пептидам *M. bovis*, и содержат иммуногенные эпитопы, свойственные патогенным штаммам.

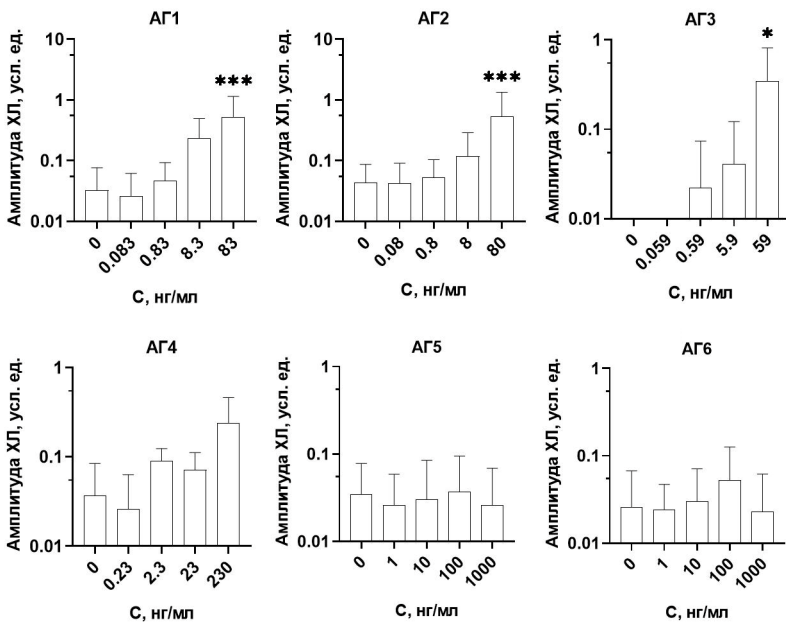
Для измерения продукции АФК использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [9]. При оценке действия антигенов в пробы добавляли антиген или растворитель (контрольные образцы). Исходная концентрация антигенов, мг/мл: АГ1 – 0.083; АГ-2 – 0.08; АГ3 – 0.059; АГ4 – 0.23; АГ5 – 1.0; АГ6 – 1.0. Для стимуляции клеток использовали формилованный пептид fMLF (N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин,  $10^{-5}$  М), опсонизированный зимозан (ОЗ, 125 мкг/мл) и форбол-12-миристат-13-ацетат (РМА,  $10^{-6}$  М). Измерения проводили в трёх технических повторах и не менее чем в трех биологических повторах.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием ПО GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software). Результаты представлены на графиках как среднее значение и стандартное отклонение.

**Результаты.** Взаимодействие с гипериммунной сывороткой кролика показало, что высокой серологической активностью обладают белковые фракции с молекулярной массой 10, 22, 24 и 40 кДа (АГ1-4, соответственно). Исследование оксидазной активности показало, что АГ 1-3 способны вызывать дозозависимую продукцию АФК КМ-гранулоцитами мыши, тогда как АГ4 и синтетические АГ5-6 не обладают способностью стимулировать оксидазную активность гранулоцитов (рис. 1).

Способность запускать респираторный ответ гранулоцитов присуща нескольким типам рецепторов: рецепторам формилованных пептидов FPR1/2, фрагментов комплимента C3aR/C5aR/CRs, фактора активации тромбоцитов PAFRs, пиримидиновым рецепторам P2Y2R, также генерацию АФК стимулирует фагоцитоз при активации FcR, CLR, SR и других. Мы полагаем, что мишенями исследуемых микобактериальных пептидов могут быть FPR, лектиновые и рецепторы-мусорщики, способные узнавать гликопротеины, а также TLR, распознающие патоген-ассоциированные образы.

Активация НАДФН-оксидазы гранулоцитов происходит при фосфорилировании субъединиц фермента протеинкиназой С (PKC) и их сборке на плазматической мембране; PKC является эффекторной молекулой при стимуляции как FPR, так и Fc-рецепторов [10,11]. При стимуляции FPR происходит G $\beta$  $\gamma$ /PLC $\beta$ -зависимая активация PKC, тогда как при стимуляции FcR запускается путь Src/PI3K/PLC $\gamma$ -зависимой активации PKC. Для оценки вклада указанных сигнальных путей в активацию НАДФН-оксидазы антигенами микобактерий мы использовали три стимула, два из которых, fMLF и ОЗ, запускают рецептор-опосредованную активацию оксидазной активности гранулоцитов через FPR и FcR, соответственно, и РМА, который напрямую активирует PKC.

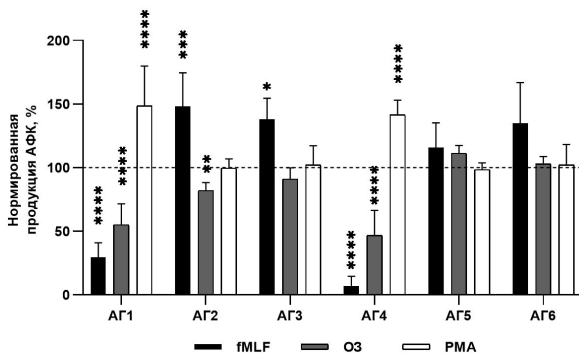


**Рис. 1.** Зависимость амплитуды ХЛ от концентрации исследуемых пептидных антигенов ( $n = 5$ ; ось  $x$  – ХЛ, усл. ед., ось  $y$  – концентрация антигена, нг/мл; 0 – контроль, растворитель; \* –  $p \leq 0.05$ ; \*\*\* –  $p \leq 0.001$ , двухфакторный дисперсионный анализ и тест Даннета).

Было выявлено значительное ингибирование FPR- и FcR-вызванного респираторного ответа гранулоцитов, предобработанных АГ1 и АГ4 в концентрации 1/1000 от исходной (рис. 2, fMLF и ОЗ), в то же время предобработка АГ1 и АГ4 вызывала достоверное усиление ответа на РМА (рис. 2).

Учитывая, что данные белки сами активировали оксидазную активность гранулоцитов, подавление ответов на fMLF может свидетельствовать о том, что АГ1 и АГ4 могут связываться и активировать FPR и вызывать их десенситизацию. Подавление ОЗ-вызванной продукции АФК микобактериальными белками может быть обусловлено несколькими факторами: подавлением захвата опсонизированных частиц зимозана, подавлением созревания фагосом и подавлением сигнальных путей активации НАДФН-оксидазы. Усиление ответа на РМА после инкубации с АГ1 и АГ4 может происходить за счет дополнительной активации/фосфорилирования РКС и НАДФН-оксидазы.

Белки АГ2 и АГ3 усиливали продукцию АФК в ответ на fMLF, обеспечивая аддитивное или праймирующее действие, вероятно, за счет перекрестного взаимодействия с FPR-зависимыми сигнальными путями, но не с РКС. Подобного эффекта для этих антигенных белков при стимуляции FcR и РКС форболовым эфиром мы не обнаружили.



**Рис. 2.** Влияние пептидных антигенов на стимулированную продукцию АФК. Нормированная продукция рассчитана как отношение продукции АФК в образцах клеток, обработанных антигенами в течение 25 мин до добавления стимула, к продукции АФК в образцах клеток, не обработанных антигенами, принятой за 100% (контроль, пунктирная линия) (\* –  $p \leq 0.05$ ; \*\* –  $p \leq 0.01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* –  $p \leq 0.0001$ , двухфакторный дисперсионный анализ и тест Даннета).

**Выводы.** Таким образом, серологически активные микобактериальные белки способны активировать продукцию АФК в КМ-гранулоцитах мыши. Наиболее вероятными кандидатами на взаимодействие с микобактериальными белками выступают рецепторы формилированных пептидов, поскольку эти белки способны модулировать ответ на агонисты FPR fMLF.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Futosi K., Fodor S., Mócsai A.* // *Int. Immunopharmacol.* 2013. 17(3): 638-50.
2. *Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A.* // *Annu. Rev. Pathol.* 2014. 9: 181-218.
3. *Killick K.E., Ní Cheallaigh C., O'Farrelly C. et al.* // *Cell Microbiol.* 2013. 15(9): 1484-95.
4. *Lyadova I.V.* // *Mediators Inflamm.* 2017. 2017: 8619307.
5. *Almeida F.M., Ventura T.L., Amaral E.P. et al.* // *PLoS One.* 2017. 12(3): e0173715.
6. *Borkute R.R., Woelke S., Pei G., Dorhoi A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(9): 4801.
7. *Su R., Peng Y.P., Deng Z. et al.* // *Front. Microbiol.* 2019. 10: 1468.
8. *Corleis B., Korbelt D., Wilson R. et al.* // *Cell Microbiol.* 2012. 14(7): 1109-21.
9. *Filina Y.V., Tikhonova I.V., Gabdoulkhakova A.G. et al.* // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2023. 1869(12): 119356.
10. *Nguyen G.T., Green E.R., Mecsas J.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017. 7: 373.

# ДЛИТЕЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ РЕЗИДЕНТНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПОДАВЛЯЕТ АВТОМАТИЮ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА СЕРДЦА ПОСРЕДСТВОМ ГИСТАМИНОВЫХ H1 РЕЦЕПТОРОВ

*Кузьмин В.С.<sup>1,2</sup>, Воронина Я.А.<sup>1,2</sup>, Абрамов А.А.<sup>1</sup>,  
Кархов А.М.<sup>1</sup>, Федоров А.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория электрофизиологии сердца института экспериментальной кардиологии НМИЦ Кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, Москва, Россия

**Введение.** Доминантный ритмоводитель сердца, располагающийся в синоатриальном узле (САУ) обеспечивает ритмическую работу сердца на протяжении всей жизни. САУ и является крайне сложно организованной структурой, которая включает пейсмекерные кардиомиоциты, а также немиокардиальные элементы, соединительную ткань. Соединительная ткань САУ выполняет функцию каркаса или «матрикса» и формирует микросреду для погруженных в нее, взаимосвязанных кластеров пейсмекерных кардиомиоцитов [1]. Соединительнотканная составляющая САУ критически важна для его функционирования. К настоящему времени показано, что в САУ крайне высок уровень экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток. Клеточная составляющая соединительной ткани САУ представлена т.н. «резидентными» или тканевыми иммунными клетками, к которым относят макрофаги [2] и тучные клетки (ТК) [3]. Атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемическое и реперфузионное повреждение, кардиомиопатии различной этиологии приводят к кратному увеличению количества резидентных ТК в сердце. Негативные, провоспалительные эффекты, наблюдаемые при повреждении и ремоделировании миокарда, в значительной степени опосредованы ТК [4]. При заболеваниях, сопровождаемых воспалительной реакцией или иммунным ответом часто возникают нарушения ритма сердца - суправентрикулярные тахикардии, синусовые брадикардии. Эти и другие данные позволяют предположить, что резидентные тучные клетки САУ при их длительной стимуляции могут оказывать существенное влияние на пейсмекерную активность САУ или приводить к его дисфункции.

При активации ТК высвобождают огромное количество регуляторных соединений, основным из которых является гистамин. В 1970-80-х г. было показано, что гистамин влияет на способность САУ генерировать потенциалы действия [5]. Тем не менее, рецепторные механизмы влияния резидентных ТК на функционирование САУ не исследованы. К настоящему моменту известно 4 типа мембранных рецепторов гистамина (H1-H4) [6] и все подтипы экспрессируются в

сердце. Остается неизвестным, однако, то какой из подтипов рецепторов определяет эффекты гистамина в пейсмекере сердца, особенно при длительной стимуляции ТК. В связи с вышесказанным, цель данной работы заключалась в исследовании эффектов длительной (хронической) стимуляции тучных клеток на биоэлектрическую активность САУ, а также выяснение рецепторных механизмов этого действия.

**Методика.** В экспериментах использовали половозрелых самцов стока Wistar (300-350 г, возраст 4 мес.). Наркотизированным (изофлуран, 1.5-2% об.) животным контрольной группы в течение 5 сут вводили внутривенно, через хвостовую вену физ. р-р (0.5 мл). Животным экспериментальной группы в течение 5 сут водили р-р (0.5 мл), содержащий 150 мг/кг/сут ципрофлоксацина (ЦПФН). У наркотизированных животных в до начала введения ЦПФН, а также через 5 сут после введения ЦПФН регистрировали ЭКГ и оценивали частоту сердечных сокращений (ЧСС) в контрольных условиях, либо на фоне двойной автономной блокады (комбинированное действие атенолола и атропина – 2 и мг/кг, соответственно).

После регистрации ЭКГ у животных получали тканевые образцы, включающие область САУ. Осуществляли перфузию изолированных тканевых образцов р-ром Тироде при 37°C. Для обнаружения особенностей паттерна активации в САУ от животных получавших ЦПФН использовали метод оптического картирования. Образцы обрабатывали потенциалчувствительным зондом di-4-ANEPPS (1 мкМ). Система оптического картирования электрической активности миокардиальной ткани включала фотодиодную матрицу CardioPDA-III (RedShirtImaging, Decatur, GA, USA) в комплекте с программным обеспечением (Cardioplex v.8.2.1). Определяли локализацию точки первичной активации (ТПА), а также площадь первичной активации (площадь, охватываемая возбуждением за первые 2 мс) в САУ контрольных животных, а также животных, получавших ЦПФН после аппликации гистамина (10 мкМ, 3 мин), а также гистамин на фоне действия селективных антагонистов H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub> рецепторов (дифенгидрамин, 10 мкМ; фамотидин, 10 мкМ).

Для подтверждения локализации тучных клеток в САУ на уровне белка и мРНК использовали иммунофлюоресцентную микроскопию и РВ-ПЦР. Для этого изолировали тканевые участки (5 мм<sup>2</sup>) межвенной области стенки правого предсердия, окружающие область бифуркации артерии синусного узла. Изготавливали криосрезы, которые обрабатывали первичными антителами к маркеру пейсмекерных кардиомиоцитов (ионных каналов HCN4), маркеру тучных клеток c-kit (CD117). Криосрезы САУ одной из экспериментальных групп обрабатывали антителами к адренорецепторам  $\alpha$ 1A-подтипа (ThermoFisher scientific). Для визуализации использовали вторичные антитела, конъюгированные с флюорофором AlexaFluor 488, либо Cy3. Окрашенные срезы сканировали

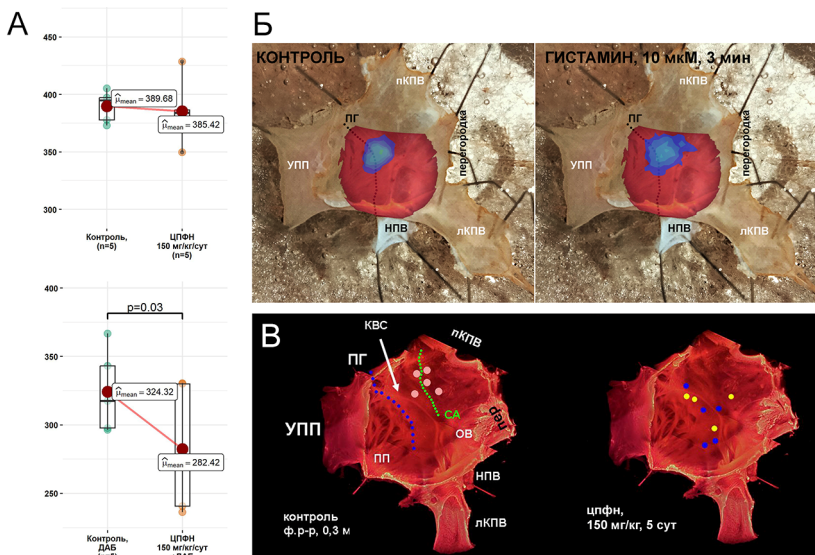
на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710; стекдовые изображения анализировали с помощью ПО ImageJ.

Для оценки уровня экспрессии маркерных мРНК тучных клеток в САУ образцы подготавливали стандартным способом. Реакцию РВ-ПЦР осуществляли с использованием qPCRmix-HS SYBR kit (Евроген, Россия) на амплификаторе CFX-96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). Для каждой реакции с SYBR Green производили анализ кривых плавления, пороговые числа циклов ПЦР были определены при помощи программы LinRegPCR version 2020.2. Использовали прямой и обратный праймеры специфичные для *Rattus norvegicus* к генам  $\beta$ -триптазы (Trpsb2), и CD117 (Kit). В качестве гена «домашнего хозяйства» использовали Rplp0. Для определения относительного уровня мРНК использовали  $\Delta\Delta Ct$  метод с учетом эффективности праймеров.

Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью критерия Мана-Уитни или ANOVA (с применением апостериорных тестов после внесения поправки Даннета). Различия считались значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее  $\pm$  ст. откл.

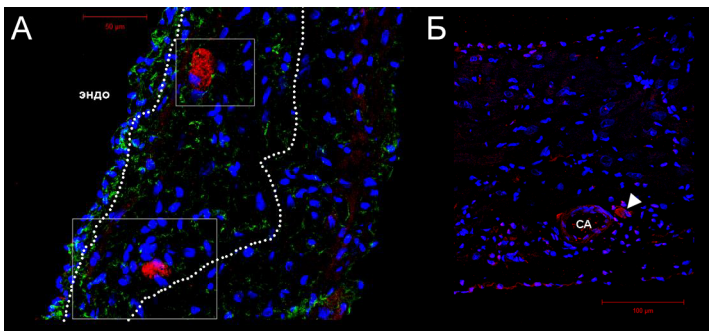
**Результаты и обсуждение.** В *in vivo* экспериментах с регистрацией ЭКГ нами установлено, что ЦПФН не влияет на ЧСС у крыс после его введения животным в течение 5 сут. Тем менее, в условиях подавления активности симпатического и парасимпатического компонентов вегетативной нервной системы (ВНС) ЧСС у крыс, получавших ципрофлоксацин оказывается снижена (на  $13 \pm 2\%$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.03$ , рис. 1А). Снижения ЧСС не наблюдается у контрольных животных. Этот факт указывает на изменение способности кардиомиоцитов САУ генерировать ритм, в тех условиях, когда его электрофизиологическая активность лишена модуляции со стороны симпатического отдела ВНС, а также находится под воздействием факторов, высвобождаемых хронически-стимулируемыми тучными клетками, в т.ч. гистамином.

В экспериментах картированием электрической активности установлено, что в САУ контрольных животных гистамин вызывает увеличение площади первичной активации ( $21 \pm 2\%$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.02$ ), что сопровождается ростом частоты спонтанных возбуждений САУ ( $17 \pm 5\%$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.01$ ), которое не сопровождалось заметным смещением ТПА в САУ. Увеличение ЧСС и частоты спонтанных возбуждений в САУ при действии гистамина является типичным, ранее установленным, феноменом. Гистамин у контрольных животных вызывает смещение ТПА только в присутствии антагониста H2-рецепторов фамотидина ( $1.1 \pm 0.4$  мм,  $n = 5$ ). В САУ крыс, получавших ЦПФН при действии гистамина обнаруживается существенная миграция ТПА ( $1.8 \pm 0.7$  мм,  $n = 5$ ) из области бифуркации артерии САУ в направлении устья верхней поллой вены (рис. 1Б, В).



**Рис. 1.** А. Влияние субхронического (5 сут) введения активатора/стимулятора дегрануляции тучных клеток ципрофлоксацина (ЦПФН) на частоту сердечных сокращений (ЧСС) в контрольных условиях (сверху), а также на фоне «двойной автономной блокады» (ДАБ, комбинация атиенолола и атропина, снизу) у крыс возрастом 4 мес. Б. Репрезентативные примеры, демонстрирующие зону первичной активации в тканевых препаратах САУ крысы, а также изменение площади первичной активации при действии гистамина (10 мкМ). В. Субхроническое введение ципрофлоксацина изменяет эффекты гистамина в САУ, вызывая смещение точки первичной активации (ТПА). Локализация ТПА в контрольных условиях показана розовыми и синими точками; при действии гистамина – желтыми точками. ПКПВ – правая краниальная полая вена; ЛКПВ – левая краниальная полая вена; НПВ – нижняя полая вена; УПП – ушко правого предсердия; ПП- правое предсердие; ПГ – пограничный гребешок; КВС – клапан венозного синуса; СА – артерия синусного узла; ОВ – овальная ямка.

С использованием иммунофлуоресцентной микроскопии нами установлено, что в ткани САУ в области бифуркации его артерии, содержащей HCN4-позитивную флюоресценцию (т.е. пейсмекерной области САУ), обнаруживаются крупные клетки, экспрессирующие c-kit (CD117, рис. 2А). Нами также установлено, что относительный уровень экспрессии маркерных генов тучных клеток (Kit, Tpsb2) в образцах ткани пейсмекерной части САУ значимо (в 5-7 раз) выше, чем в образцах ткани левого предсердия. Следует отметить, что для клеток САУ, экспрессирующих c-kit, а также демонстрирующих морфологию ТК, характерен высокий уровень иммуноэкспрессии адrenoрецепторов  $\alpha 1A$ -подтипа (рис. 2Б).



**Рис. 2.** А. С-kit-позитивные клетки (тучные клетки, красный псевдоцвет, П АТ-Су3 555) в области стенки правого предсердия, экспрессирующей белки ионных каналов HCN4 (зеленый псевдоцвет, П АТ Alexa Fluor 488, ограничена белым пунктиром). Б. Клетки, демонстрирующие морфологию ТК и экспрессию адrenoцепторов  $\alpha 1A$ -подтипа на периферии артерии САУ (СА).

**Выводы.** Нами впервые подтверждено на уровне белка и мРНК, что ткань САУ включает значительное количество тучных клеток, которые являются функционально активными. Возможно, что адrenoцепторы  $\alpha 1A$ -подтипа ТК участвуют в их стабилизации и предотвращают грануляцию при интактной симпатической иннервации сердца. Стабилизирующее действие адrenoцепторов предотвращает снижение ЧСС у крыс, получавших ЦПФН в отсутствие двойной автономной блокады. Снижение ЧСС, наблюдаемое у крыс *in vivo* вероятно обусловлено смещением ТПА в область САУ, обладающей латентной активностью, и опосредовано, преимущественно, активацией гистаминовых H1 рецепторов. Вероятно, что длительная стимуляция ТК приводит не только к изменению паттерна активации САУ, но и изменению профиля экспрессии гистаминовых рецепторов, ремоделированию пейсмекера сердца. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 22-15-00189).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dobrzynski H., Li J., Tellez J. et al. // *Circulation*. 2005. 111(7): 846-54.
2. Souza D.S., Barreto T.O., Santana M.N.S. et al. // 2019. 112(5): 588-91.
3. Aminu A.J., Petkova M., Atkinson A.J. et al. // *Prog Biophys Mol Biol*. 2021. 166: 86-104.
4. Janicki J.S., Brower G.L., Levick S.P. // *Methods Mol. Biol*. 2015. 1220: 121-39.
5. Sanchez-Chapula J., Elizalde A. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 1987. 336(2): 218-23.
6. Panula P. // *Handb. Clin. Neurol*. 2021. 180: 377-87.



# УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫХ АМПА-РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

*Ларюшкин Д.П., Теплов И.Ю., Косенков А.М., Гайдин С.Г., Зинченко В.П.*

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пушкино, Россия

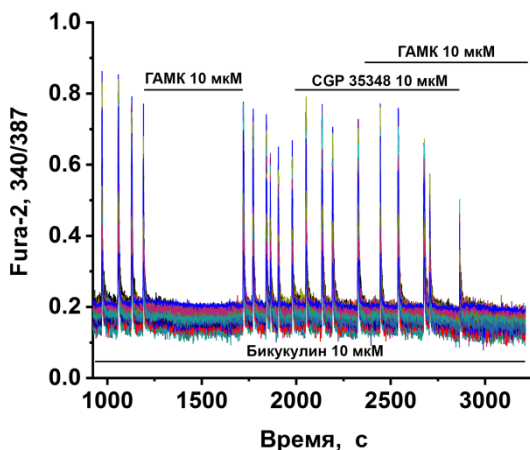
**Резюме.** Эпилептиформная активность, вызванная ослаблением ГАМК(А)-рецептор-опосредованного торможения, сопровождается взрывной пачечной активностью потенциалов действия, проявляющейся в виде кластеров пароксизмальных деполяризационных сдвигов (PDS) и осцилляциями внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ). В формировании кластера PDS участвуют несколько потенциал- и лиганд-зависимых ионных каналов и рецепторов, набор которых индивидуален для каждого нейрона. Ранее мы показали, что в гиппокампе присутствуют ГАМКергические нейроны, экспрессирующие глутаматные кальций-проводящие АМПА-рецепторы (CP-AMPA), принимающие участие в синаптической пластичности и выполняющие функцию контроля активности других ГАМКергических нейронов. В настоящей работе показано, что CP-AMPA участвуют в контроле эпилептиформной активности нейрональной сети *in vitro*. Показано, что CP-AMPA ГАМКергических нейронов регулируют потенциал нейрона после PDS и амплитуду  $Ca^{2+}$  осцилляций путём ГАМК(В)-рецептор-опосредованной активации калиевых каналов Kv7 типа в другой популяции ГАМКергических нейронов, что приводит к их торможению и возбуждению иннервируемых ими глутаматергических нейронов. Антагонист CP-AMPA, NASPM, подавляет амплитуду  $Ca^{2+}$  сигнала при эпилептиформной активности в большой популяции глутаматергических нейронов. NASPM также подавляет скорость гиперполяризации в течение кластера и отдельных PDS, но не влияет на амплитуду деполяризационного сдвига. Действие NASPM имитируется блокатором Kv7 каналов, XE991. Таким образом, Kv7 каналы контролируют фазу гиперполяризации после деполяризационного сдвига в кластере и индивидуальных PDS.

## ***1. CP-АМПА-рецепторы и нейроны их экспрессирующие.***

Кальций-проницаемые АМПА-рецепторы (CP-AMPA), наряду с NMDAR, играют существенную роль в синаптической пластичности [1]. Кроме того, антагонисты CP-AMPA являются противоэпилептическими и нейропротекторными препаратами. Учитывая, что CP-AMPA во взрослом организме локализованы преимущественно в ГАМКергических нейронах [2,3], одна из функций которых состоит в подавлении

возбуждения других ГАМКергических нейронов [4], противозипилептическое действие антагонистов СР-AMPA можно объяснить именно этим путём сигнализации. В случае эпилептиформной активности, вызванной блокированием ГАМК(А)-рецепторов, передача сигнала может осуществляться с участием ГАМК(В)-рецепторов.

**2. ГАМК(В)-рецепторы.** На рисунке 1 показано, что антагонист ГАМК(А)-рецепторов, бикикулин, вызывает синхронные осцилляции  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах в культуре клеток гиппокампа крысы, при этом, ГАМК полностью подавляет колебания. В присутствии антагонистов ГАМК(А)- и ГАМК(В)-рецепторов действие ГАМК отменяется, указывая на участие обоих типов рецепторов в подавлении колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  ГАМК.



**Рис. 1.** В присутствии антагониста ГАМК(А)-рецептора ГАМК подавляет осцилляции  $[Ca^{2+}]_i$ , взаимодействуя с ГАМК(В)-рецепторами.

Активность ГАМК(В)-рецепторов опосредуется  $G_i/o$  белками, которые активируют калиевые каналы, и подавляют активность потенциал-зависимых кальциевых каналов, причём это действие может осуществляться либо за счёт дефосфорилирования этих каналов, либо за счёт связывания их с  $G\beta\gamma$ . Одна из особенностей этих рецепторов состоит в том, что они локализованы в разных терминалях (пре- и постсинаптических). В пресинапсе  $\beta\gamma$  субъединица ГАМК(В)-рецепторов ингибирует кальциевые каналы, (автоингибирование) и, соответственно, секрецию ГАМК, что приводит к возбуждению последующего нейрона. В постсинапсе  $\beta\gamma$  активирует калиевые каналы и это приводит к снижению возбудимости нейрона.

**3. Потенциал-зависимые калиевые каналы  $Kv7$  типа.** Одним из калиевых каналов, активируемых  $\beta\gamma$  субъединицей, является  $Kv7$ . Каналы этого типа относятся к эпилептогенным низкопороговым потенциал-

зависимым калиевым каналам. Они генерируют медленные токи (100-300 мс) уже при  $-60$  мВ и практически не инактивируются, уменьшая, с одной стороны, возбудимость нейронов [5,6], а с другой стороны, они могут определять длительность кластеров PDS и их частоту, поскольку эти каналы активны тогда, когда другие каналы инактивированы и не могут гиперполяризовать мембрану. Известно, что Kv7 каналы локализованы в начальном сегменте аксона (в сайте генерации потенциала действия) как в возбуждающих пирамидальных нейронах, так и в ГАМКергических нейронах гиппокампа [7]. Точное функциональное значение такой локализации неизвестно. Мутации в субъединицах канала вызывают эпилепсию [8], а агонисты канала подавляют приступы эпилепсии [9]. Рецепторы, сопряжённые с G-белком, активирующим фосфолипазу C (ФлС), ингибируют Kv7 [10]. Это обусловлено способностью рецептора активироваться не только деполяризацией и  $\beta\gamma$  субъединицей G белка, но и субстратом ФлС – фосфоинозитидом (PIP2). Это свойство открывает возможность для регуляции его активности, а также обуславливает возбуждение нейронных ансамблей рецепторами, сопряжёнными с ФлС и PI3K. Повышение  $[Ca^{2+}]_i$  при участии CaM+Ca2 пути также ингибирует Kv7 каналы [11]. Кроме того сАМР-зависимое фосфорилирование активирует Kv7 канал [12]. Для прямого подавления активности канала мы использовали прямой антагонист Kv7 XE991 [13].

#### ***4. Клеточный коррелят эпилептиформной активности.***

Эпилептиформная активность является сложным процессом, в котором участвует множество ионных каналов и других сигнальных молекул. Эпилептиформная активность – это особая форма гипервозбуждения, которая возникает в результате синхронизации бёрстовой/взрывной активности множества нейронов [14]. Ещё в 60-х годах было показано, что этот процесс низкочастотного высокоамплитудного ритма, регистрируемый ЭЭГ, имеет клеточный коррелят – кластеры пароксизмального деполяризационного сдвига (PDS) [15], сопровождающиеся синхронными высокоамплитудными осцилляциями  $[Ca^{2+}]_i$ . Экспериментально показано, что кластеры PDS можно индуцировать *in vitro* различными способами. Режим периодической генерации кластеров PDS возникает при подавлении ГАМК-зависимого торможения антагонистами ГАМК(A)-рецепторов пикротоксином или бикукулином [16].

PDS сильно напоминают гигантские деполяризующие потенциалы (GDP), которые наблюдаются в первые послеродовые дни у детёнышей крыс и которые, как полагают, контролируют развитие нейронов [17]. Можно предположить, что PDS воспроизводят процессы «развития» в полностью созревших нейронных цепях либо при повреждениях, либо с целью формирования новых нейрональных связей.

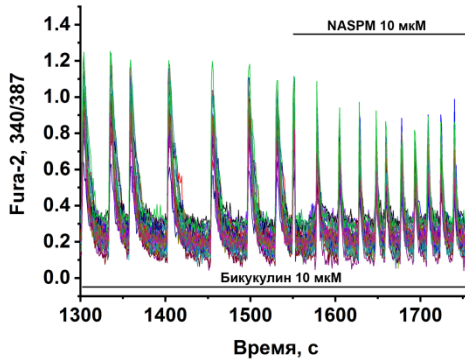
Позднее кластеры PDS были зарегистрированы не только при эпилепсии, но и при травматических повреждениях мозга, после или перед

инсультом, при болезнях Паркинсона и Альцгеймера [18]. Вещества, подавляющие PDS, являются антиэпилептическими и нейропротекторными.

Как кластер, так и индивидуальный PDS можно разделить на две составляющие – деполяризующий ток и реполяризующий ток. Деполяризующий ток назвали «В-током» от термина «Burst». Этот  $Ca^{2+}$  ток определяется различными типами  $Ca^{2+}$  каналов [19]. Реполяризующий ток определяется различными калиевыми каналами. Природа каналов, иницирующих PDS, неизвестна и их регуляция не изучена.

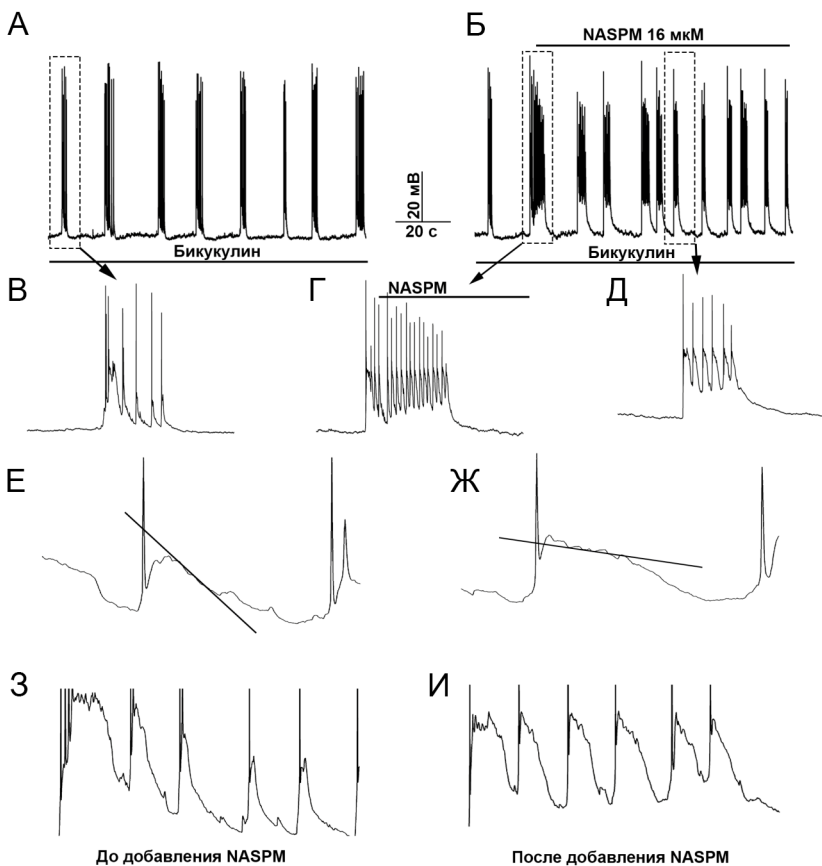
Задача работы состоит в установлении сигнального пути CP-AMPA – ГАМК – ГАМК(B)R – Kv7 и его роли в регуляции гипервозбуждения при эпилепсии. В клеточной модели синхронной эпилептиформной активности нейронов гиппокампа предполагалось определить, какие параметры предэпилептического ритма, индуцированного выключением ГАМК(A)-рецептор-опосредованного торможения, меняются при изменении активности CP-AMPA рецепторов.

**Результаты. Антагонист CP-AMPA уменьшает амплитуду  $[Ca^{2+}]_i$  осцилляций в определенных нейронах.** Ранее было показано, что снятие ГАМК(A)-рецептор-опосредованного торможения антагонистом ГАМК(A)-рецепторов, бичукулином, приводит к возникновению эпилептиформной активности в нейронах *in vitro*. Активность выражается в появлении высокоамплитудных пачек потенциалов действия, названных кластерами PDS и сопровождаемых осцилляциями  $[Ca^{2+}]_i$ . На рисунке 2 показано действие антагониста CP-AMPA, NASPM, на периодические  $[Ca^{2+}]_i$  осцилляции при эпилептиформной активности, вызванной антагонистом ГАМК(A)-рецепторов, бичукулином. NASPM действует неоднозначно: с одной стороны он снижает амплитуду  $[Ca^{2+}]_i$  осцилляций в большинстве глутаматергических нейронов, что является признаком подавления возбуждения, но одновременно с этим NASPM увеличивает частоту синхронных  $[Ca^{2+}]_i$  осцилляций во всех нейронах, что является признаком возбуждения пейсмекерных низкороговых нейронов. Ранее было показано, что NASPM подавляет амплитуду  $Ca^{2+}$  ответа (повышение  $[Ca^{2+}]_i$ ) как в группе ГАМКергических нейронов, экспрессирующих CP-AMPA, так и в большой группе глутаматергических нейронов [4]. Предполагалось, что NASPM-зависимое торможение глутаматергических нейронов является опосредованным и происходит в результате активации другой популяции ГАМКергических нейронов, контролируемых нейронами, содержащими CP-AMPA. Таким образом, в механизм действия NASPM вмешивается взаимодействие нейронов разного подтипа. Поскольку NASPM не подавляет кальциевые осцилляции полностью, то CP-AMPA не участвуют в генерации колебаний, но вносят вклад в  $Ca^{2+}$  ответ в определённых популяциях нейронов, включая ГАМКергические.



**Рис. 2.** NASPM подавляет амплитуду осцилляций  $[Ca^{2+}]_i$ ; в большинстве нейронов и повышает их частоту.

Поскольку CP-AMPA локализованы преимущественно в ГАМКергических нейронах, и их активация вызывает секрецию ГАМК, для выяснения последующих путей передачи сигнала с CP-AMPA мы исследовали методом пэтч-кламп действие NASPM на кластеры PDS в ГАМКергических нейронах. На рисунке 3 приведены изменения мембранного потенциала ГАМКергического нейрона в режиме эпилептиформной активности, вызванной антагонистом ГАМК(A)-рецепторов (рис. 3А). Добавление NASPM увеличивает частоту кластеров (рис. 3Б), что коррелирует с увеличением частоты  $[Ca^{2+}]_i$  осцилляций на рисунке 2. Изменение структуры кластеров более подробно показаны на рисунке 3В, Г, Д. В контроле амплитуда кластера после достижения максимума уменьшается (рис. 3В), что означает гиперполяризацию мембраны. NASPM отменяет эту гиперполяризацию кластера PDS, по-видимому, за счёт ингибирования какого-то калиевого канала (рис. 3Г). Отсутствие гиперполяризации сохраняется во всех последующих пачках ПД в присутствии NASPM (рис. 3Д). Все PDS в кластере имеют равную амплитуду, близкую амплитуде первого импульса. Отсутствие действия NASPM на амплитуду кластера и отдельных PDS указывает на участие различных каналов в формировании деполяризационного сдвига и последующей гиперполяризации. По-видимому, добавление NASPM приводит к ингибированию  $K^+$  канала, который принимает участие в гиперполяризации кластера, но не в генерации деполяризационного сдвига. Анализ формы PDS (рис. 3Е, Ж) показывает, что он состоит из быстрой фазы деполяризационного сдвига и двух фаз гиперполяризации - медленной и быстрой. NASPM ингибировал и удлинял первую медленную фазу гиперполяризации (рис. 3Е, Ж), расширяя импульс PDS (3,И). Таким образом, NASPM-зависимый  $K^+$  канал участвует в гиперполяризации как кластера, так и PDS.

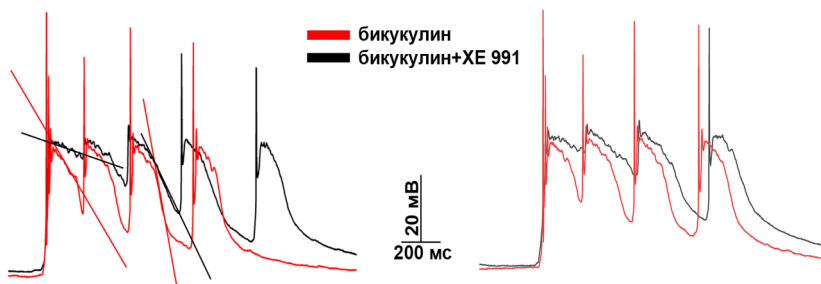


**Рис. 3.** Генерации пачек потенциалов действия (ПД) ГАМКергическим нейроном в режиме эпилептиформной активности, вызванной антагонистом ГАМК(A)-рецепторов, бикукулином. (А) – Контроль. (Б) – Антагонист CP-AMPA, NASPM, увеличивает частоту пачек ПД. (В) – один из кластеров PDS до добавления NASPM, (Г) – NASPM отменяет гиперполяризацию после деполяризационного сдвига. (Д) - один из кластеров PDS после добавления NASPM. (Е, З) – PDS до добавления NASPM, (Ж, И) – PDS после добавления NASPM.

Поскольку ГАМК(A)-рецептор в наших условиях инактивирован бикукулином, то передача сигнала осуществляется через ГАМК(B)-рецептор. В этом случае эффект NASPM может быть вызван ингибированием калиевого канала вследствие ослабления передачи с участием  $G\beta\gamma$  субъединицы ГАМК(B)-рецептора. Чтобы проверить это предположение мы использовали прямой блокатор  $Kv7$ , XE991.

***Действие блокатора Kv7 каналов, XE991, на мембранный потенциал при эпилептиформной активности нейронов гиппокампа.***

На рисунке 4 показано изменение PDS в двух кластерах при действии блокатора Kv7 каналов (XE991, чёрная кривая). Так же как и NASPM, XE991 не влияет на амплитуду и передний фронт PDS, что говорит о неучастии канала в деполяриационном сдвиге. Так же как и NASPM, XE991 подавляет гиперполяризацию кластера и скорость первой фазы гиперполяризации в индивидуальных PDS. Таким образом, CP-AMPA-рецепторы ГАМКергических нейронов через секрецию ГАМК могут активировать ГАМК(В)-рецепторы других ГАМКергических нейронов. При этом  $\beta\gamma$  субъединица Gi белка ГАМК(В)-рецепторов активирует постсинаптический  $K^+$  канал, гиперполяризует мембрану и тормозит последующий ГАМКергический нейрон, что приводит в возбуждению иннервируемых им глутаматергических нейронов. В рамках данной схемы передачи сигнала деполяризующее действие NASPM можно объяснить тем, что NASPM ингибирует  $Ca^{2+}$  ответ и соответствующую секрецию ГАМК в ГАМК-нейронах, экспрессирующих CP-AMPA. В отсутствие ГАМК ГАМК(В)-рецептор перестаёт генерировать  $\beta\gamma$ , которая перестаёт активировать калиевый канал, и гиперполяризация не возникает.



**Рис. 4.** Изменение PDS в кластере при действии блокатора XE991 (черная кривая).

Анализ участия ГАМКергических нейронов, экспрессирующих CP-AMPA, и Kv7 каналов в эпилептиформной активности нейронов позволил не только установить сигнальный путь, связывающий эти рецепторы через секрецию ГАМК и активацию ГАМК(В)-рецепторов, но и доказать, что деполяриационный сдвиг и последующая реполяризация осуществляются различными ионными каналами, а Kv7 каналы участвуют в реполяризации после деполяризующего сдвига и не участвуют в генерации PDS.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-25-00659.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Dolgacheva L.P., Tuleukhanov S.T., Zinchenko V.P.* // Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol. 2020. 14(3): 194-204.
2. *Bureau I., Bischoff S., Heinemann S.F., Mulle C.* // J. Neurosci. 1999. 19(2): 653-63.
3. *Wang H.X., Gao W.J.* // J. Physiol. 2010. 588: 2823-38.
4. *Zinchenko V.P., Gaidin S.G., Teplov I.Yu. et al.* // Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol. 2020. 14(1): 44-53.
5. *Brown D.A., Passmore G. M.* // Br. J. Pharmacol. 2009. 156: 1185-95.
6. *Barrese V., Stott, J.B., Greenwood I.A.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2018. 58: 625-73.
7. *Cooper E. C., Harrington E., Jan Y.N., Jan L.Y.* // J. Neurosci. 2001. 21: 9529-40.
8. *Nappi P., Miceli F., Soldovieri M.V. et al.* // Pflugers Arch. 2020. 472: 881-98.
9. *Miceli F., Soldovieri M.V., Martire M., Tagliatalata M.* // Curr. Opin. Pharmacol. 2008. 8: 65-74.
10. *Marrion N.V.* // Annu. Rev. Physiol. 1997. 59: 483-504.
11. *Tobelaim W.S., Dvir M., Lebel G. et al.* // Channels. 2017. 11: 686-95.
12. *Schroeder B.C., Kubisch C., Stein V., Jentsch T.J.* // Nature. 1998. 396: 687-90.
13. *Shah M.M., Migliore M., Valencia I. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. 112: 6497-502.
14. *Jiruska P. et al.* // J. Physiol. 2013. 591(4): 787-97.
15. *Meyer C., Kettner A., Hochenegg U. et al.* // Neuroscience. 2021. 468: 265-81.
16. *Schiller Y.* // J. Neurophysiol. 2002. 88(6): 2954-62.
17. *Mohajerani M.H., Cherubini E.* // Eur. J. Neurosci. 2005. 22(1): 107-18.
18. *Kubista H., Boehm S., Hotka M.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. 20(3): 577.
19. *Bower J.M., Beeman D.* // The Book of GENESIS. 1998. Springer, New York.

### АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ ДИАФРАГМЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

*Сибгатуллина Г.В., Хузахметова В.Ф., Ценцевицкий А.Н., Бухараева Э.А.*

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный  
центр РАН, Казань, Россия

**Введение.** Нервно-мышечное соединение (НМС), посредством которого передается стимул от аксона мотонейрона к мышечному волокну – важнейший элемент для выполнения дыхательной и двигательной функций. В ходе развития организма на разных этапах постнатального онтогенеза НМС претерпевает значимые морфологические и функциональные изменения [1,2]. Особый интерес вызывают механизмы эндогенной модуляции синаптической функции в НМС по мере взросления.



В последние десятилетия была выявлена тесная колокализация симпатических нервных окончаний с НМС. Кроме того, были обнаружены эффекты симпатической иннервации и экзогенных адреномиметиков и адrenoблокаторов на функциональное состояние НМС. Эти данные свидетельствуют о важной роли симпатической нервной системы в поддержании оптимальной активности холинергической синаптической передачи [3]. Симпатические аксоны располагаются в периферической нервной системе вместе с моторными и сенсорными аксонами, а также окружают кровеносные сосуды вблизи мышечного волокна [4,5].

Ранее мы показали, что в НМС скелетных мышц разного функционального профиля эффекты адреналина и норадреналина на секрецию ацетилхолина из двигательных нервных окончаний реализуются разными подтипами адренорецепторов, зависят от функционального типа мышцы и режима ее ритмической активности [6-9]. В области НМС нами была визуализирована тирозингидроксилаза, участвующая в синтезе катехоламинов [10]. В растворе, омывающем изолированные нервно-мышечные препараты, было выявлено наличие эндогенного норадреналина [11].

Целью настоящего исследования было оценить наличие адренорецепторов  $\alpha_2$  и  $\beta_2$  подтипов в области НМС диафрагмальной мышцы на разных стадиях постнатального онтогенеза.

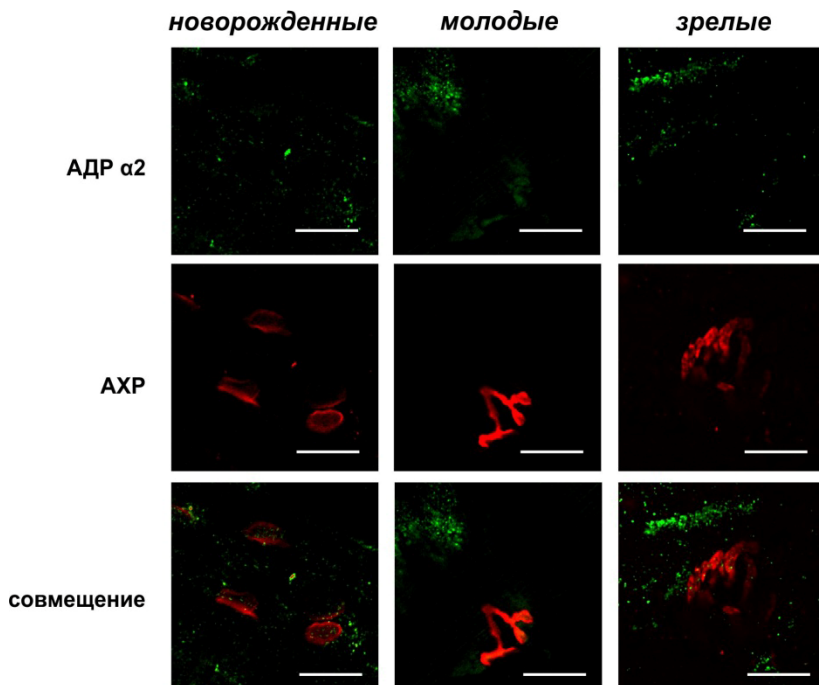
Были исследованы три возрастные группы мышечей: новорожденные (P3-P5), молодые (1 мес) и зрелые (6 мес). Установлено, что НМС новорожденных животных морфологически значимо отличаются от НМС взрослых, и уже на ранних этапах постнатального развития вблизи формирующихся синапсов отмечается наличие адренорецепторов обоих подтипов.

**Материалы и методы. Выделение нервно-мышечных препаратов.** Исследования проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах дыхательной мышцы диафрагмы лабораторных мышечей линии balb/c обоих полов, содержащихся в условиях 12 часов света и 12 часов темноты; вода и еда были предоставлены в свободном доступе. Все эксперименты проводились согласно протоколу ухода за животными и требованиям Директивы Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС и были одобрены комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол № 23-1/23-2/2 от 28 февраля 2023 г). После декапитации выделенную диафрагму фиксировали 30 мин в 4% параформальдегиде (Sigma, США), приготовленном на 0.1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7.4 (PBS, Sigma, США).

**Иммуногистохимическое окрашивание.** Окрашивание препарата проводили по стандартной методике [12]. Инкубацию с моноклональными первичными антителами к адренорецепторам  $\alpha_2$  подтипа (1:200; Invitrogen, США) и  $\beta_2$  подтипа (1:200, Sigma, США) производили в

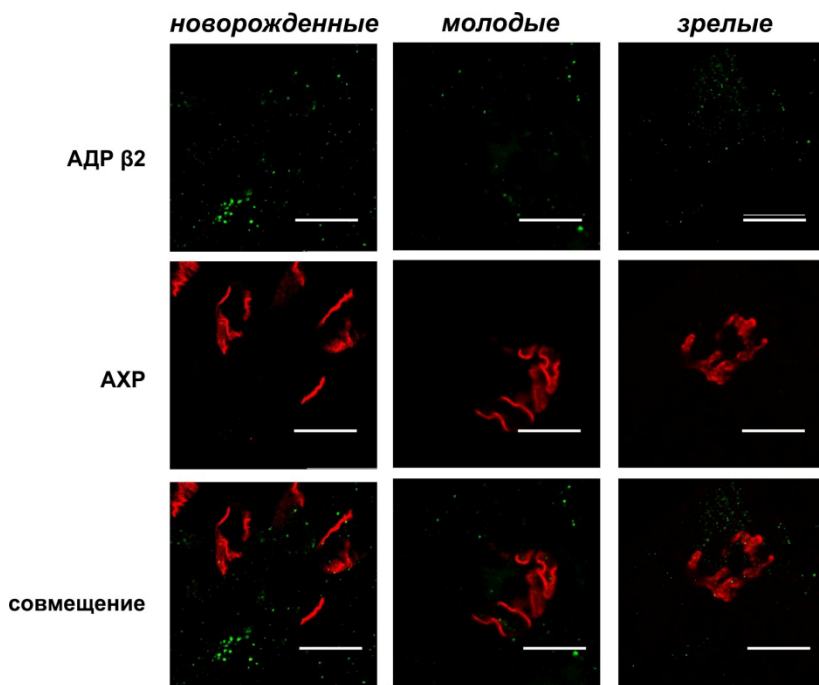
течение 15 ч при 4°C в присутствии 1% БСА. Затем препараты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 (Invitrogen, США) в разведении 2:200, а также с маркером ацетилхолиновых рецепторов тетраметилпродамин- $\alpha$ -бунгаротоксином (Sigma, США) в концентрации 20 мкг/мл. Флуоресценцию антител регистрировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия) при возбуждении аргоновым лазером с длиной волны возбуждения 488 нм и регистрации при 520 нм для Alexa488 и длиной волны возбуждения 514 нм и регистрации при 550-590 нм для тетраметилпродамин- $\alpha$ -бунгаротоксина.

Обработку полученных изображений проводили с помощью лицензионного программного пакета LASX (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий оценивали с помощью ANOVA. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ ; количество экспериментальных животных –  $n \geq 3$ .



**Рис. 1.** Визуализация  $\alpha 2$  подтипа адренорецепторов в области нервно-мышечных соединений диафрагмальной мышцы мышей разного возраста. Масштаб 20 мкм

**Результаты и обсуждение.** Анализ полученных изображений показал, что исследуемые НМС имеют значимые возрастные морфологические различия по форме и площади постсинаптических областей, окрашиваемых тетраметилпродамин- $\alpha$ -бунгаротоксином – маркером ацетилхолиновых рецепторов (рис. 1, 2). Так, у новорожденных мышей эти области имели вид пластинок, тогда как старшие возраста характеризовались более сложным разветвленным «грозеобразным» рисунком.

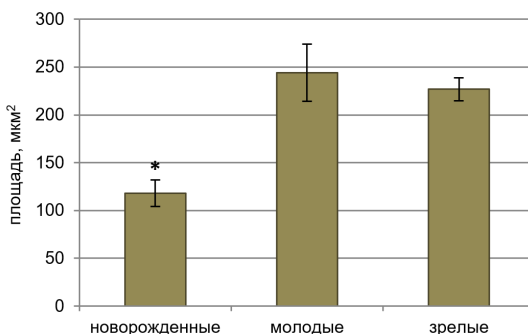


**Рис. 2.** Визуализация  $\beta 2$  подтипа адренорецепторов в области нервно-мышечных соединений диафрагмальной мышцы мышей разного возраста. Масштаб 20 мкм

Площади областей, визуализирующих холинорецепторы в НМС новорожденных мышей, были примерно в два раза меньше по сравнению с таковыми у более взрослых животных (рис. 3). Это указывает на существенные морфологические изменения НМС в ходе созревания.

Иммуногистохимическое окрашивание с применением специфичных антител показало присутствие обоих подтипов адренорецепторов в области НМС мышей всех исследуемых возрастов (рис. 1, 2). При этом даже в ранний постнатальный период в препаратах

обнаруживалось много сигналов флуоресцентных меток от соответствующих антител. Интересно отметить, что у новорожденных животных метки рецепторов визуализировались относительно равномерно по всему препарату, тогда как у старших они располагались более компактно, отдельными областями, а также встречались участки без окрашивания.



**Рис. 3.** Изменение площади нервно-мышечных синапсов в ходе взросления мышей. \* $p < 0.05$ .

Наиболее выраженную иммуноположительную реакцию с антителами проявляли  $\alpha 2$  адренорецепторы в НМС всех возрастов (рис. 1), тогда как рецепторы  $\beta 2$  типа были более представлены у новорожденных животных (рис. 2). Это хорошо согласуется с результатами, полученными на препаратах мышцы поднимателя уха, где показано, что окрашивание  $\beta 2$  адренорецепторов было выраженным у мышей P0 и немного уменьшалось в более позднем возрасте [4]. Полученные нами изображения, к сожалению, не дают возможности точно локализовать участки НМС, где расположены адренорецепторы. Тем не менее, есть данные, полученные на препаратах других скелетных мышц, что  $\beta 2$  рецепторы могут находиться непосредственно на самой сарколемме [13,14], а их активация фенотеролом приводит к гиперполяризации постсинаптической мембраны [15]. Эффекты агонистов  $\alpha 2$  адренорецепторов на процессы квантовой секреции ацетилхолина в синапсах диафрагмы и устранение их специфическими блокаторами указывает на важную роль этих рецепторов в работе НМС у взрослых животных [8,9].

Наличие адренорецепторов  $\alpha 2$  и  $\beta 2$  подтипов в области НМС у новорожденных животных и изменение их представительства в ходе старения организма могут быть важными факторами, участвующими в обеспечении гетеросинаптической пластичности синапса на разных этапах постнатального онтогенеза.

Работа поддержана грантом РФФ 23-15-00124.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Khuzakhmetova V., Samigullin D., Nurullin L. et al.* // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2014. 34: 9-18.
2. *Khuzakhmetova V.F., Nurullin L.F., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E.* // *Dokl. Biol. Sci.* 2016. 470(1): 220-3.
3. *Bukharaeva E., Khuzakhmetova V., Dmitrieva S., Tsentsevitsky A.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(9): 4611.
4. *Straka T., Vita V., Prokshi K. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. 19(7): 1935
5. *Rodrigues A.C.Z., Messi M.L., Wang Z.M. et al.* // *Acta Physiol.* 2019. 225: e13195.
6. *Khuzakhmetova V., Bukharaeva E.* // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2021. 41(2): 395-401.
7. *Tsentsevitsky A.N., Kovyazina I.V., Bukharaeva E.A.* // *Neuroscience.* 2019. 15(423): 162-71.
8. *Tsentsevitsky A., Nurullin L., Tyapkina O., Bukharaeva E.* // *Mol. Cell. Neurosci.* 2020. 108: 103550.
9. *Petrov A., Zakirjanova G., Kovyazina I. et al.* // *Life Sci.* 2022. 296: 120433.
10. *Дмитриева С.А., Вологин С.Г., Ценцевичский А.Н. и др.* // *Биохимия.* 2023. 88(3): 443-54.
11. *Дмитриева С.А., Вологин С.Г., Ценцевичский А.Н. и др.* // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей.* 2021. 1: 400-4.
12. *Pratt S.J., Iyer S.R., Shah S.B., Lovering R.M.* // *Methods Mol. Biol.* 2018: 57-72.
13. *Kim Y.S., Sainz R., Molenaar P.* // *Biochem. Pharmacol.* 1991. 42: 1783-89.
14. *Lynch G.S., Ryall J.G.* // *Physiol. Rev.* 2008. 88(2): 729-67.
15. *Arkhipov A., Khuzakhmetova V., Petrov A.M., Bukharaeva E.A.* // *Brain Res.* 2022. 1795: 148072.

### РОЛЬ ОРФАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ БЕЛКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕСТОСТЕРОНА

*Слепнев А.А., Попова Н.М., Сеиджулиева А.А.,  
Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н.*

Рязанский государственный медицинский университет имени академика  
И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, Россия

**Введение.** Орфанные рецепторы являются членами суперсемейства ядерных рецепторов, к которым относятся печеночный X рецептор подтипа альфа (LXR $\alpha$ ), конститутивный андростановый рецептор (CAR), прегнан X рецептор (PXR), фарназоид X рецептор (FXR) [1-3]. Для данной группы рецепторов доказана важная биологическая роль. Так, LXR $\alpha$  принимает участие в регуляции метаболизма липидов и холестерина, CAR и PXR – внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного баланса, FXR – в регуляции синтеза желчных кислот. Кроме того, эти рецепторы могут принимать участие в регуляции

ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохромов P450), а также белков-транспортеров [4].

В ряде исследований было показано, что половые гормоны могут регулировать LXR $\alpha$  [5], CAR [6], PXR [7], FXR [8,9]. В литературе описано влияние эстрадиола и прогестерона на белок резистентности рака молочной железы (BCRP, ABCG2) [10,11]. В то же время действие тестостерона на BCRP и участие орфанных рецепторов в данном процессе не изучалось.

Именно поэтому было выполнено комплексное исследование, целью которого было изучение воздействия тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Caco-2 и оценка участия орфанных рецепторов в данном процессе.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали согласно протоколу [12] в 6-луночных планшетах. Тестостерон («Sigma Aldrich», США) добавляли к монослою клеток в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. Клетки контрольной группы инкубировали в течение 24 ч в питательной среде с добавлением этанола (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0.01%.

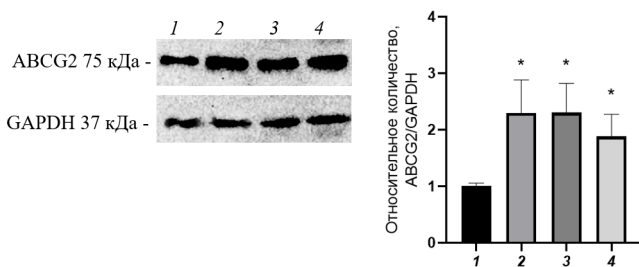
Для оценки роли орфанных рецепторов (LXR $\alpha$ , CAR, PXR, FXR) совместно с андрогеном в концентрации 10 мкМ к клеткам добавляли ингибитор LXR $\alpha$  – 3-(3,4-Диметоксифенил)-N-[4 (трифлуорометил)фенил]-2-пропенамид, N-(4-Трифлуорометилфенил) 3,4-диметоксипиперазинамид 30 мкМ (TFCA, «Sigma Aldrich», США) [13], ингибитор CAR – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-ил этиловый эфир карбаминовой кислоты 10 мкМ (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) [14], ингибитор PXR – кетоконазол 10 мкМ («Sigma Aldrich», США) [15], ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевую кислоту в концентрации 200 мкМ ( $\beta$ -TA, «Sigma Aldrich», США) [16]. Ингибиторы добавляли за 30 мин до внесения гормонов.

После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с поверхности лунок раствором трипсин-ЭДТА (0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», США), трижды промывали раствором фосфатного буфера («Bio-Rad», США) и лизировали в буфере RIPA («Sigma-Aldrich», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ. Полученный клеточный лизат использовали для определения ABCG2 методом вестерн-блот [17] с использованием первичных кроличьих антител (ABCG2 antibody, CSB-PA001081GA01HU, «Cusabio», США) в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000.

Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Количество ABCG2 оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США), разведение 1:1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), разведение 1:4000).

Полученные результаты анализировали с помощью программы GraphPad Prism Version 9.5.0. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

**Результаты.** При инкубации клеток линии Сасо-2 с тестостероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ отмечалось увеличение относительного количества белка ABCG2 на 129.5%, 130.2% и 88.5% ( $p < 0.01$  для каждой серии) относительно контрольных значений (рис. 1).

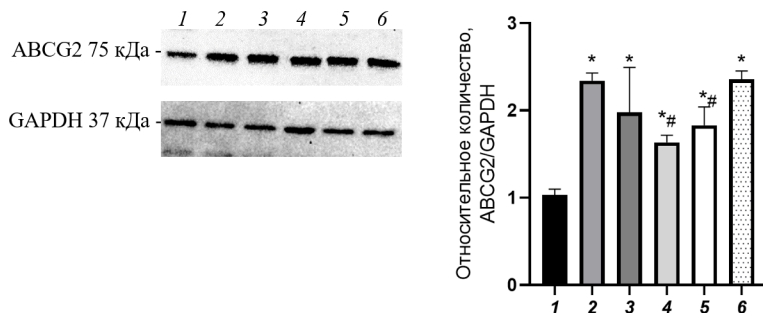


**Рис. 1.** Относительное количество белка ABCG2 в клетках линии Сасо-2 в контроле (1) и при воздействии тестостерона в концентрациях 1 (2), 10 (3) и 100 мкМ (4). Примечание: \* $p < 0.01$  – статистически значимые отличия от показателей контроля.

Тестостерон в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество ABCG2 на 135.6% ( $p < 0.0002$ ) по сравнению с контролем.

Ингибитор PXR – кетоконазол и ингибитор FXR – тауро- $\beta$ -холевая кислота снижали индуцирующее действие тестостерона, количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2 снижались на 30.6% ( $p = 0.02$ ) и 18.1% ( $p = 0.05$ ) соответственно по сравнению с изолированным применением тестостерона, тем не менее уровень транспортера превышал показатели контроля на 63.4% ( $p = 0.05$ ) и 93.0% ( $p = 0.01$ ) относительно контроля (рис. 2).

Ингибитор LXR $\alpha$  – TFCA и ингибитор CAR – CINPA1 достоверного эффекта на индуцирующее действие тестостерона не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 134.1% ( $p = 0.0002$ ) и 97.9% ( $p = 0.004$ ) и достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 2).



**Рис. 2.** Относительное количество белка ABCG2 в клетках линии Caco-2 в контроле (1) и при воздействии тестостерона в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибитором LXR $\alpha$  – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетокеназол (4), FXR –  $\beta$ -ТА (5). **Примечание.** \* $p \leq 0.01$  – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p \leq 0.05$  – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения протестерона.

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлено, что тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ повышает количество ABCG2 в клетках линии Caco-2 опосредовано через рецепторы PXR и FXR.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Shi Y. // Drug Discov. Today. 2007.12(11-12): 440-5.
2. Serviddio G., Bellanti F., Vendemiale G. // Free Radic. Biol. Med. 2014. 1: S6.
3. Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. // Mol. Cell Endocrinol. 2022. 548: 111618.
4. Krasowski M.D., Ni A., Hagey L.R., Ekins S. // Mol. Cell Endocrinol. 2011. 334(1-2): 39-48.
5. Jin B., Wang W., Bai W. et al. // Acta Histochem. 2017. 119(6): 610-9.
6. Kawamoto T., Kakizak S., Yoshinari K., Negishi M. // Mol. Endocrinol. 2000. 14: 1897-905.
7. Blumberg B., Sabbagh W., Juguilon H. et al. // Genes Dev. 1998. 12(20): 3195-205.
8. Milona A., Owen B.M., Cobbold J.F. et al. // Hepatology. 2010. 52(4): 1341-9.
9. Wang S., Lai K., Moy F.J. et al. // Endocrinology. 2006. 147(9): 4025-33.
10. Ee P.L., Kamalakaran S., Tonetti D. et al. // Cancer Res. 2004. 64(4): 1247-51.
11. Wang H., Zhou L., Gupta A. et al. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006. 290(5): 798-807.



12. *Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Erokhina P.D. et al. // Biochemistry (Mosc.). 2021. 6(2):197-206.*
13. *Sim W.C., Kim D.G., Lee K.J. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. 355(3): 362-9.*
14. *Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. // Mol. Pharmacol. 2015. 87 (5): 878-89.*
15. *Kota B.P., Tran V.H., Allen J. et al. // Pharmacol Res. 2010. 62(5): 426-31.*
16. *Sayin S.I., Wahlström A., Felin J. et al. // Cell Metab. 2013. 17(2): 225-35.*
17. *Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А. // Биологические мембраны. 2022. 39(2): 107-15.*

## ДИНАМИКА ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ PAR1 РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ

*Сысоев М.Д.<sup>1,2</sup>, Свешикова А.Н.<sup>2,3,4</sup>*

<sup>1</sup>РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

<sup>3</sup>ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной физико-химической инженерии, Москва, Россия

**Введение.** Явление активации тромбоцитов и образования тромбоцитарных агрегатов вызывают интерес с точки зрения молекулярной физиологии.

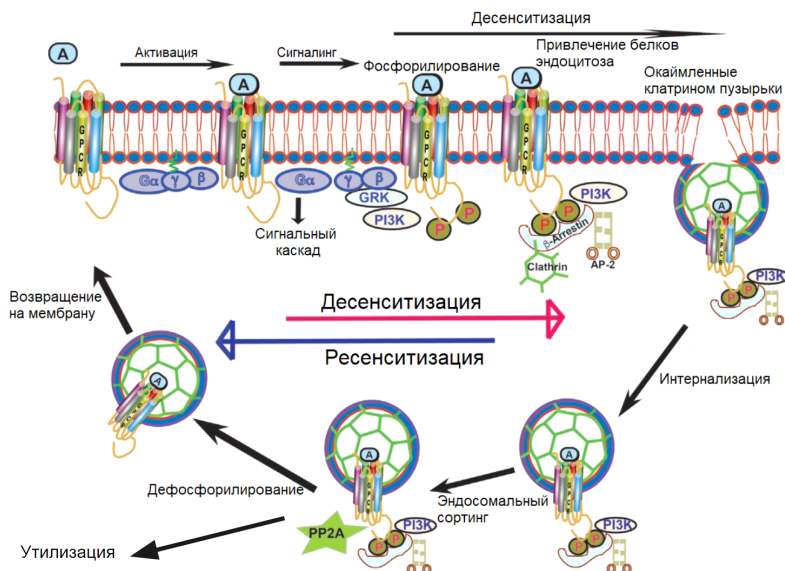
Рецепторы, ассоциированные с G-белком (GPCR) – семейство трансмембранных рецепторов, ключевых регуляторов многих клеточных ответов, таких как зрение, сердечная сократимость, обоняние. В ответ на растворимые индукторы, такие как тромбин или АДФ, активация тромбоцитов происходит через GPCR-опосредованные сигнальные пути, приводящие к запуску кальциевой сигнализации или подавлению цАМФ сигнализации. Большинство GPCR опосредуют физиологические ответы через циклический процесс активации рецептора, приводящий к инициированию нисходящих сигналов и десенситизации рецептора, или его инактивации, которая приводит к ослаблению нисходящих сигналов, для некоторых рецепторов далее следует ресенситизация рецептора – реактивация рецептора для следующей волны активации (рис. 1).

**Актуальность.** Изучение процессов десенситизации рецепторов – важное направление в молекулярной физиологии и системной биологии. Оно включает в себя исследование внутриклеточной сигнализации и построение моделей, описывающих этот процесс. Также имеет приложения в фармакологии: разработка лигандов, селективно приводящих к десенситизации определенного класса рецептора.

Десенситизация рецепторов также имеет место в патогенезе некоторых патологических процессов. Так, установлено, что при

повышении кровоточивости у некоторых пациентов с COVID-19 наблюдаются тромбоциты, по фенотипу схожие с тромбоцитами с десенситизированными тромбином рецепторами PAR1 [2].

**Целью** настоящей работы было экспериментальное наблюдение и математическое моделирование процесса десенситизации рецепторов PAR1 тромбоцитов человека.

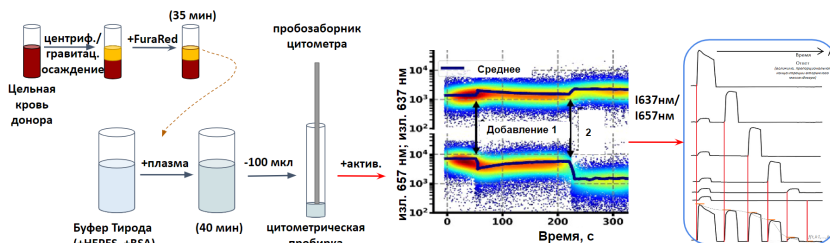


**Рис. 1.** Классический взгляд на процессы десенситизации и ресенситизации GPCR. Адаптировано из [1].

**Материалы и методы.** Кровь здоровых доноров забирали из локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие гирудин (Sarstedt Monovette©). Кровь была окрашена кальций-чувствительным флуорофором Fura-Red в концентрации 2 мкМ в присутствии 0.1 ед/мл апиразы в течение 35 мин при 37°C. По истечении 35 мин отбирали богатую тромбоцитами плазму, образованную при осаждении эритроцитов, и разводили буфером Тирода (134 мМ NaCl; 0.34 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.9 мМ KCl; 12 мМ NaHCO<sub>3</sub>; 20 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы; 1 мМ MgCl<sub>2</sub>; 2 мМ CaCl<sub>2</sub>; БСА 2% по массе; pH 7.3) до концентрации тромбоцитов  $1 \times 10^3$  в мл.

Исследование проведено посредством проточного цитометра BD FACS Canto II. Пробы анализировали в кинетическом режиме. В начале исследования к пробам добавляли активатор SFLLRN (1 мкМ). Анализ результатов проточной цитометрии выполнен с применением FlowJo 10.0.7r2 и Python 3.8.8.

Изучения динамики десенситизации GPCR с Gq-сигнализацией проводилось на основе проточной цитофлуориметрии с помощью флуоресцентного кальциевого зонда Fura Red (рис. 2). В работе используется проточный цитофлуориметр BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).



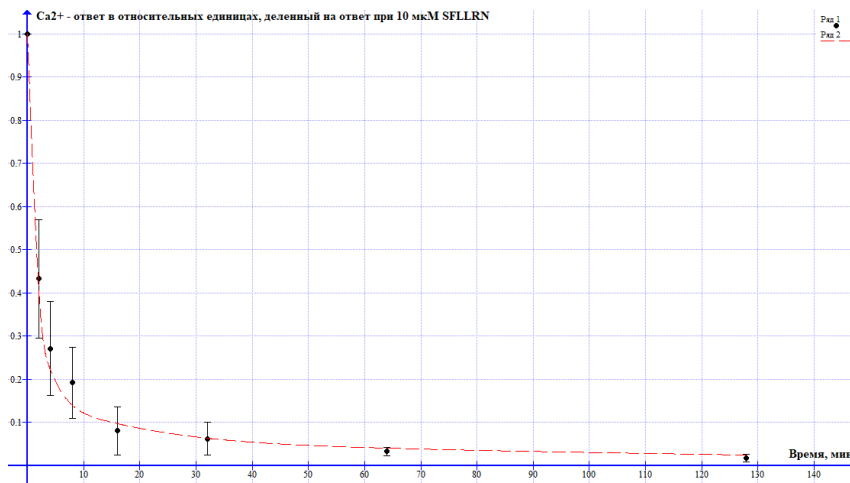
**Рис. 2.** Принцип изучения динамики десенситизации GPCR с Gq-сигнализацией на основе проточной цитофлуориметрии с помощью флуоресцентного кальциевого зонда Fura Red.

Осуществляются две добавки активатора SFLLRN: первая, создающая концентрацию активатора 1 мкМ (вызывающая десенситизацию) и вторая, создающая концентрацию 10 мкМ (связывающая оставшиеся доступные рецепторы тромбоцита). В качестве времени ожидания между добавками выбраны 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 минут.

Для описания экспериментальных данных использовалась ранее разработанная нами математическая модель индуцируемой через PAR1 рецептор кальциевой сигнализации в тромбоцитах человека [3], в которой десенситизация рецепторов описывалась простым экспоненциальным уравнением с константой десенситизации  $k = 20 \text{ с}^{-1}$  [4].

**Результаты.** Были получены экспериментальные данные десенситизации PAR1 1 мкМ SFLLRN у шести различных здоровых доноров (рис. 3). Среднее ослабление кальциевого ответа более чем в два раза наблюдается уже на 2-й минуте, более чем в четыре раза – на 8-й минуте. Пик кальциевой сигнализации стабильно снижается на протяжении 128 минут. Ресенситизация рецепторов не наблюдалась.

Для описания полученных экспериментальных данных была подобрана константа десенситизации рецепторов и порядок реакции десенситизации (рис. 3, красная кривая).



**Рис. 3.** Черные точки – экспериментальные данные (среднее значение,  $n = 6$  доноров), диапазон – 95% ДИ. Красной пунктирной линией показаны значения, полученные в кинетической модели.  $R^2 > 0.95$ ; критерий согласия Пирсона  $p < 0.01$ .

**Заключение.** В настоящей работе наблюдается динамика десенситизации PAR1 рецепторов тромбоцитов человека. Согласно полученным данным, десенситизация рецепторов наблюдается согласно реакции 4 порядка с константой скорости  $1.5 \times 10^{23} (\text{M}^3 \times \text{c})^{-1}$ . Ресенситизация рецепторов в настоящей экспериментальной постановке не наблюдается. Суммарно, эти данные позволяют уточнить фундаментальные представления об активации тромбоцитов тромбином.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gupta M.K. et al. // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2018. 339: 63-91.
2. Martyanov A.A. et al. // Thromb. Res. 2022; 211: 27-37.
3. Sveshnikova A.N. et al. // Mol. Biosyst. 2015. 11(4): 1052-60.
4. Lenoci L. et al. // Mol. Biosyst. 2011. 7(4): 1129-37.

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ ВЗРЫВ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

*Тихонова И.В.<sup>1</sup>, Дюкина А.Р.<sup>1</sup>, Косякова Н.И.<sup>2</sup>, Сафронова В.Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

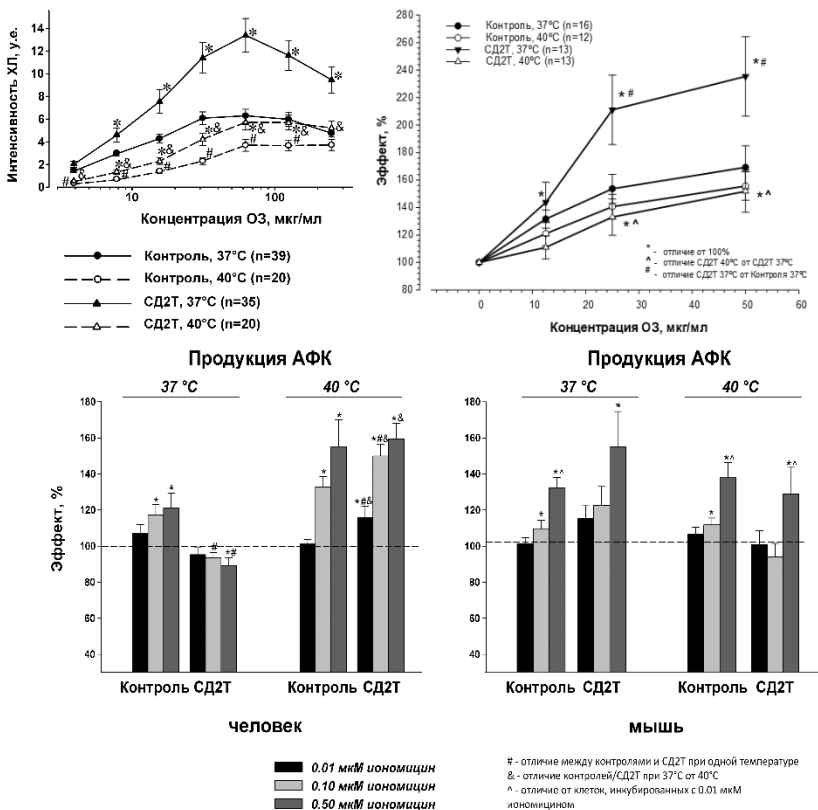
<sup>2</sup>Больница Пушкинского научного центра Российской академии наук, Пушкино, Россия

**Введение.** Гипертермия (увеличение температуры тела выше 37°C), как известно, сопровождается развитием воспалительного процесса, являющегося защитной реакцией организма на инфицирование [1]. Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) сопровождается хроническим воспалением, при котором иммунные клетки находятся под влиянием воспалительных факторов в течение продолжительного времени, что может приводить к нарушению регуляции их функций и усугублению патологического процесса [2]. Гипергликемия при СД2Т создает благоприятные условия для бактериальных и грибковых инфекций, что является фактором высокого риска вследствие измененного состояния иммунных клеток, в том числе гранулоцитов [3]. Генерация активных форм кислорода (АФК), одна из наиболее мощных защитных функций гранулоцитов, модифицирована у больных СД2Т [4,5], при этом влияние гипертермии (в физиологических пределах) на эту функцию остается малоизученным при СД2Т у человека [6] и не исследовано на моделях СД2Т у животных, которые используются для выяснения механизмов заболевания и его осложнений, скрининга разрабатываемых лекарственных препаратов и проведения функциональных проб. Целью работы является сопоставление результатов исследования  $Ca^{2+}$ - и ПКС-опосредованной регуляции генерации АФК гранулоцитами человека и мыши при СД2Т.

**Методы.** Исследование проведено на гранулоцитах крови человека и костного мозга мышей линии C57BL/6j. Клетки человека выделяли из периферической крови условно здоровых добровольцев и пациентов с СД2Т [5,6]. Работа выполнена на базе Больницы Пушкинского научного центра РАН при получении письменного информированного согласия участников в соответствии с Хельсинской Декларацией [7] и протоколом локального этического комитета Больницы (№ 2 от 10.04.2014). Гранулоциты костного мозга мышей были получены от контрольных животных, находящихся на стандартной диете (260 ккал/100 г), и

животных с СД2Т, потреблявших высокожировой корм (516 ккал/100 г) и имевших соответствующие биохимические показатели (высокий уровень глюкозы в крови, измененный липидный профиль, повышенные уровни печеночных ферментов АЛТ и АСТ). Мыши, находящиеся на высокожировой диете, служили моделью СД2Т у животных, близкой к СД2Т у человека. При работе с животными мы руководствовались протоколом комиссии по уходу и использованию животных ИБК РАН № 12306, 2006. Клетки инкубировали в эугликемической среде (5.5 мМ глюкоза) в присутствии 0.01-0.5 мкМ иономицина и активировали 1 мкМ форболовым эфиром (Sigma, USA) при 37°C и 40°C. Регистрировали интенсивность генерации АФК, далее анализировали кинетические параметры ответа: скорость развития, амплитуда, время до максимума ( $T_{\text{макс}}$ ), продукция АФК. Оценка редокс-статуса в клетках мышей была проведена с помощью зонда RedoxSensor Red CC-1 (Life Technologies, USA) при активации клеток опсонизированным зимозаном (ОЗ, 12.5-50 мкг/мл). Данные обработаны с использованием программы MATLAB (MATHWORK INC., USA).

**Результаты и их обсуждение.** Интенсивность спонтанной генерации АФК не различалась в крови больных и контролей как при 37°C, так и при 40°C. Также не обнаружено различий для образцов клеток при измерении интенсивности генерации АФК клетками человека или мыши, так и при оценке редокс-статуса клеток мышей. Данные свидетельствуют о состоянии покоя фагоцитов при СД2Т у человека и мыши. Кинетические параметры дыхательного ответа на ОЗ фагоцитов в одной периферической крови человека в контроле и у больных СД2Т значительно понижались при повышении температуры от 37°C до 40°C. Сравнение параметров ответов клеток пациентов с СД2Т с контрольными показало уменьшение лаг-периода и  $T_{\text{макс}}$ , увеличение скорости, амплитуды ответа и продукции АФК. При 40°C различия были меньшими, но оставались достоверными для скорости и амплитуды ответа (рис. 1, верхний слева). Следует отметить, что в клетках мышей в зависимости от концентрации ОЗ происходили изменения редокс-статуса при 37°C. Характер изменений совпадал с таковым для амплитуды ответа на ОЗ клеток человека в крови: интенсивность ответов клеток возрастала с увеличением концентрации ОЗ (в диапазоне до 50 мкг/мл), и ответы в группах с СД2Т (у пациентов и модельных животных) были значительно выше ответов в контрольных группах при 37°C (рис. 1, верхний справа). Иономицин не изменял интенсивность генерации АФК в клетках контрольных и диабетических мышей, и не выявлялась зависимость от его концентрации. В клетках человека 0.5 мкМ иономицин усиливал генерацию АФК, однако достоверных отличий от его действия в других концентрациях не было, при этом наблюдалось достоверное уменьшение параметров ответа клеток пациентов при гипертермии.



**Рис. 1.** Сравнение параметров ответов гранулоцитов человека и мыши при сахарном диабете 2 типа в условиях нормо- и гипертермии.

Известно, что при метаболических нарушениях происходит истощение пула  $Ca^{2+}$  в эндоплазматическом ретикулуме из-за повышенной активности IP3R1, что приводит к более высокому высвобождению  $Ca^{2+}$  в цитозоль и снижению функции SERCA [8]. Вероятно, действие 0.5 мкМ иономицина не приводило к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$ ; за счет высвобождения из ретикулума у пациента, вследствие чего в клетках пациентов реакция на ионофор была ослаблена. Одной из причин отличий может быть ослабленная  $Ca^{2+}$ -зависимая регуляция в гранулоцитах костного мозга по сравнению с таковой в клетках крови [9]. При синергической активации NADPH оксидазы иономицином и форболовым эфиром наблюдались как сходство, так и различия в характере изменений параметров дыхательного ответа в клетках человека и мыши в зависимости от условий инкубации.

При 37°C и концентрации иономицина 0.5 мкМ скорость ответа, амплитуда и продукция АФК значительно уменьшались, тогда как  $T_{\text{макс}}$  увеличивалось, у больных СД2Т относительно контроля, тогда как у мышей с СД2Т данные параметры не изменялись по сравнению с контролем (рис. 1). При 40°C скорость ответа клеток человека в контроле и при СД2Т значительно увеличивалась, как и в контрольной группе мышей, но она оставалась без изменений у мышей с СД2Т. Амплитуда ответа и продукция АФК клетками человека увеличивались ( $T_{\text{макс}}$  уменьшалось), с увеличением концентрации иономицина, но они возрастали ( $T_{\text{макс}}$  уменьшалось) в ответе клеток мышей только в присутствии 0.5 мкМ иономицина. Сходство состояло в том, что при 40°C не было различий между контролем и СД2Т в изменении параметров ответов клеток как человека, так и мыши (рис. 1).

**Заключение.** Таким образом, наше исследование показало частичное совпадение результатов по влиянию повышенной температуры на дыхательный взрыв гранулоцитов человека и мыши в контроле и при СД2Т. Наиболее близкими по характеру были изменения фагоцитоз-зависимых процессов, тогда как влияние повышенной температуры на определенные компоненты внутриклеточной сигнализации проявлялось в разной степени. Различная композиция мембранных компонентов может играть определенную роль в температурной зависимости регуляции активности клеток человека и мыши [10].

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №22-15-00215).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Evans S.S., Repasky E.A., Fisher D.T. // Nat. Rev. Immunol. 2015. 15: 335-49.
2. Кунраш Д.В., Недочнасов С.А. // 2016. 81(11): 1477-80.
3. Dowe R., Iqbal A., Heller S.R., Sabroe I., Prince L.R. // Front Immunol. 2021. 12: 678771.
4. Ridzuan N., John C.M., Sandrasaigaran P. // World J. Diabetes. 2016. 7(13): 271-8.
5. Tikhonova I.V., Grinevich A.A., Guseva I.E., Safronova V.G. // Free Radical Biol Med. 2020. 159: 76-86.
6. Tikhonova I.V., Grinevich A.A., Kosyakova N.I., Safronova V.G. // Free Radical Biol Med. 2022. 192: 235-45.
7. WMA Declaration of Helsinki (2018) Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects>.
8. Arruda A.P., Hotamisligil G.S. // Cell Metab. 2015. 22: 381-97.
9. Tano J.-Y., Solanki S., Lee R.H. et al. // Cardiovasc Res. 2014. 101(1): 138-44.
10. Shindou H., Hishikawa D., Harayama T. et al. // J. Biochem. 2013. 154(1): 21-8.



## СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В РАННЕМ РАЗВИТИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Фролова В.С.<sup>1</sup>, Иванова А.Д.<sup>1</sup>, Конорова М.С.<sup>1</sup>,  
Шмуkler Ю.Б.<sup>2</sup>, Никишин Д.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

**Введение.** Нейротрансмиттеры – биологически активные вещества разнообразной природы, которые играют важную роль в передаче электрохимического импульса между нейронами, а также от нейронов к клеткам мышечной ткани и железистым клеткам [1]. К классическим представителям этой группы относят некоторые аминокислоты и их производные, например, гистамин, индоламины, катехоламины – эволюционно древние молекулы, осуществляющие функции модуляторов долговременных морфофункциональных изменений в клетке [2]. Функциональная активность этих веществ была показана как для животных, не имеющих нервной системы (например, простейших и губок), так и для высших многоклеточных животных, обладающих сложноустроенной нервной системой [3,4].

Долгое время эти химические соединения изучались преимущественно в контексте передачи сигналов между нервными клетками взрослого организма. Г.А. Бузников в середине XX в. впервые постулировал регуляторную роль некоторых нейротрансмиттеров, в частности серотонина, в эмбриогенезе различных животных [5-9]. Так, для раннего развития млекопитающих показано наличие серотонина и экспрессия всех основных компонентов серотонинергической системы – ферментов синтеза и деградации, мембранных рецепторов, специфического мембранного транспортера [10]. Наличие серотонина, его транспортеров и рецепторов на ранних стадиях эмбриогенеза и способность серотонинспецифических фармакологических агентов вмешиваться в эмбриональное развитие привели к предположению, что ранние эмбрионы используют серотонин до начала нейрогенеза для регуляции клеточной пролиферации и/или морфогенетических движений [11]. Однако до сих пор представление о локализации донервных трансмиттеров, а также о распределении их рецепторов и транспортеров в эмбриональных клетках остается неполным. Целью настоящего исследования было описание характера распределения в ооцитах и доимплантационных зародышах млекопитающих серотонина и компонентов серотонинергической системы: везикулярного транспортера моноаминов Vmat2, рецепторов серотонина Htr1d и Htr2a.

**Материалы и методы. Животные.** Работу проводили на половозрелых самках мышей линии C57Bl/6, которых на ночь подсаживали к самцам для получения датированной беременности. Утро, когда была обнаружена вагинальная пробка, было принято за срок развития дрс 0.5. Эмбрионы на разных стадиях доимплантационного развития получали на сроках дрс 1.5 (двухклеточная стадия), дрс 2.0 (четырёхклеточная стадия), дрс 2.5 (восьмиклеточная стадия), дрс 3.0 (морула) и дрс 3.5 (бластоциста).

**Иммуноцитохимия.** GV-ооциты и эмбрионы фиксировали в течение одного часа при комнатной температуре, либо в течение ночи при 4°C в 4% растворе параформальдегида, разведенном на PBS. Затем ооциты и эмбрионы отмывали PBST и обрабатывали 0.25% раствором коллагеназы (ПанЭко, П011-1) или 1% раствором SDS для снятия блестящей оболочки, после чего снова отмывали PBST. В дальнейшем образцы инкубировали в течение часа в блокирующем растворе: смеси 3% BSA (Sigma-Aldrich), 1% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) и 0.01 M PBS (pH 7.4).

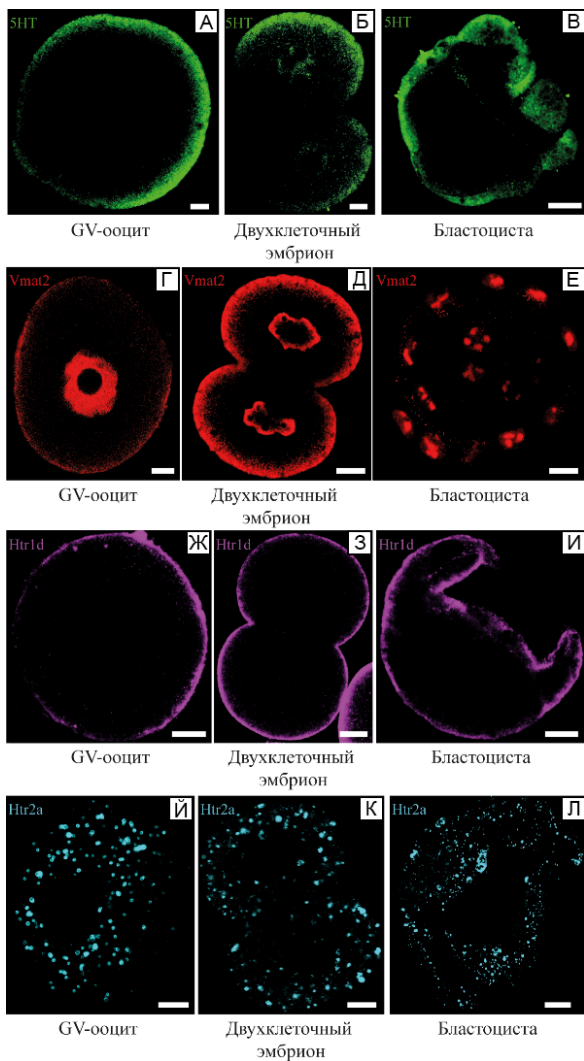
После этого инкубировали в течение ночи при 4°C в смеси блокирующего раствора и первичных антител. Были использованы следующие первичные антитела: кроличьи антитела против серотонина (Sigma-Aldrich, S5545, 1:1000), кроличьи антитела против Vmat2 (Invitrogen, PA5-77496, 1:1000); кроличьи антитела против Htr1d (Invitrogen, PA5-95901, 1:1000); кроличьи антитела против Htr2a (Invitrogen, PA5-95288, 1:1000). Затем образцы отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа в следующих вторичных антителах: FITC-конъюгированные козы антитела против IgG кролика (Jackson ImmonoResearch, 111-095-003, 1:200). Затем образцы отмывали и монтировали на предметные стекла в среду Mowiol. Анализ иммунореактивности в образцах проводили с помощью конфокальных лазерных сканирующих микроскопов Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Германия) и Leica TCS SP5 (Leica-microsystems, Япония). Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ.

**Результаты и обсуждение.** Серотонин выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и доимплантационных зародышей в виде мелких гранул. На стадии GV-ооцитов наибольшая иммунореактивность серотонина выявляется в кортикальном слое (рис. 1А) и снижается к центру яйцеклетки. Аналогичная картина наблюдается на стадиях двух- (рис. 1Б), четырех- и восьмиклеточных зародышей, а также на морулах – серотонин в большей степени выявляется в апикальном компартменте на периферии

эмбриона. На стадии бластоцисты гранулы серотонина сконцентрированы в трофобласте, тогда как во внутренней клеточной массе практически отсутствует (рис. 1В). Ранее был описан диффузный характер распределения серотонина в цитоплазме на доимплантационных стадиях развития [12], однако мы наблюдали отчетливый кортикальный паттерн распределения. Также мы провели измерение размера частиц серотонина на разных стадиях и обнаружили, что по мере развития он остаётся неизменным и составляет  $0.445 \pm 0.113$  мкм.

Везикулярный транспортер моноаминов Vmat2, ответственный за накопление серотонина в везикулярных структурах, также иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и бластомерах доимплантационных зародышей, демонстрируя схожий с серотонином паттерн окрашивания. При окрашивании антителами против Vmat2 также неспецифическое окрашивание выявляется по всему зародышевому пузырьку, за исключением ядрышкоподобного тельца. Частицы транспортера Vmat2 локализованы в кортикальном слое цитоплазмы ооцитов (рис. 1Г) и поверхностном компартменте бластомеров двух- (рис. 1Д), четырех-, восьмиклеточных эмбрионов и морул, а у бластоцист выявляется некоторое количество Vmat2-иммунопозитивных частиц в клетках трофобласта, и практически отсутствует маркирование в клетках внутренней клеточной массы (рис. 1Е). Измерение размеров частиц транспортера Vmat2 на разных стадиях показало, что он остается неизменным и составляет  $0.370 \pm 0.105$  мкм. Мы проанализировали выборки размеров частиц серотонина и Vmat2, используя критерий Краскела-Уоллиса, и обнаружили отсутствие статически значимых различий между ними, что может свидетельствовать о том, что выявляемые частицы действительно являются везикулами, в которых серотонин накоплен с помощью Vmat2. Это может свидетельствовать об активности серотонина как посредника межклеточной сигнализации на поздних стадиях оогенеза и в процессе межбластомерного взаимодействия на ранних стадиях развития.

Рецептор серотонина Htr1d иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов преимущественно в узком премембранном слое (рис. 1Ж). У доимплантационных эмбрионов рецептор Htr1d маркирует премембранную область внешних поверхностей бластомеров (рис. 1З), в бластоцисте наблюдается окрашивание слоя клеток трофобласта (рис. 1И), а во внутренней клеточной массе иммунореактивность рецептора не выявлена. Размер частиц транспортера Htr1d на разных стадиях составляют  $0.243 \pm 0.048$  мкм.



**Рис. 1.** Компоненты серотонинергической системы в доимплантационных эмбрионах мыши. (А-В) – распределение серотонина в GV-ооците (А), двухклеточном эмбрионе (Б) и бластоцисте (В); (Г-Е) – распределение везикулярного транспортера моноаминов Vmat2 в GV-ооците (Г), двухклеточном эмбрионе (Д) и бластоцисте (Е); (Ж-И) – распределение рецептора Htr1d в GV-ооците (Ж), двухклеточном эмбрионе (З) и бластоцисте (И); (Й-Л) – распределение рецептора Htr2a в GV-ооците (Й), двухклеточном эмбрионе (К) и бластоцисте (Л). Масштабный отрезок: 10 мкм.

Серотонин, везикулярный транспортер моноаминов Vmat2 и рецептор Htr1d в большей степени выявляются в клетках трофобласта, а в клетках внутренней клеточной массы их иммунореактивность выражена в гораздо меньшей степени. Этот результат говорит в пользу того, что серотонинергическая сигнализация может быть вовлечена в процесс первой клеточной дифференцировки в бластоцисте и может оказывать влияние на плюрипотентный статус клеток внутренней клеточной массы.

Рецептор серотонина Htr2a выявляется в ооцитах (рис. 1Й) в виде крупных округлых везикул, распределенных по всей цитоплазме. Аналогичная картина наблюдалась у доимплантационных зародышей (рис. 1К). В бластоцистах рецептор Htr2a выявляется как в клетках трофобласта, так и во внутренней клеточной массе (рис. 1Л). Средний диаметр везикул данного рецептора составляет  $1.226 \pm 0.097$  мкм. Паттерн распределения Htr1d- и Htr2a-иммунопозитивных частиц резко отличается: Htr1d выявляется в кортикальном слое, а Htr2a – во всей цитоплазме, при этом оба рецептора функционально активны в раннем развитии мыши [13]. Эти данные могут свидетельствовать в пользу того, что рецепторы проявляют различные функции – рецептор Htr1d может быть связан с межклеточной коммуникацией на ранних стадиях развития, а Htr2a – с метаболическими процессами внутри клетки через внутриклеточные везикулы. Одним из внутриклеточных механизмов регуляции развития может выступать серотонилирование белков, вовлеченных в различные молекулярные каскады [14]. В связи с тем, что эмбриональное развитие активно регулируется аутокринными и паракринными факторами, можно предположить, что серотонин и компоненты серотонинергической системы в раннем развитии млекопитающих могут осуществлять модуляцию действия других сигнальных молекул через механизмы кросс-толлка сигнальных путей. Однако эти гипотезы требуют дальнейшего исследования и подтверждения.

Полученные нами результаты показывают, что серотонин, транспортер Vmat2 и рецепторы Htr1d и Htr2a присутствуют как в GV-ооцитах, так и в доимплантационных эмбрионах, и пространственно неоднородно распределены в соответствии с выполнением различных функций в эмбриональных клетках, что еще раз подтверждает справедливость концепции донервных функций нейротрансмиттеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. // *Molecular Cell Biology: Neurotransmitters, Synapses, and Impulse Transmission* (4th ed.). New York: W. H. Freeman. 2000.
2. Torres G., Gainetdinov R., Caron M. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. 4: 13-25.
3. Xing L., Huttner W.B. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. 8: 391.
4. Yamamoto K., Vernier P. // *Front. Neuroanatomy.* 2011. 5: 21.

5. Бузников Г.А. // Докл. АН СССР. 1963. 152(5): 1270.
6. Бузников Г.А. // Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. 1967. – Москва, Наука. – 265 с.
7. Бузников Г.А. // Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. 1987. Москва, Наука. – 232 с.
8. Бузников Г.А. // Онтогенез. 2007. 38(4): 262-70.
9. Никитина Л.А., Трубникова О.Б., Бузников Г.А. // Онтогенез. 1993. 24: 229-36.
10. Dubé F., Amireault P. // Life sciences. 2007. 81(25-26): 1627-37.
11. Buznikov G.A., Shmukler Y.B., Lauder J.M. // Cell. Mol. Neurobiol. 1996. 16: 533-59.
12. Il'kova G., Rehak P., Vesela J. et al. // Zygote. 2004. 12. P. 205-13.
13. Amireault P., Dube F. // Mol Pharmacol. 2005. 68(6): 1678-87.
14. Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S. et al. // Nature. 2019. 567(7749): 535-9.

\*\*\*

## СИГНАЛИЗАЦИЯ В СИНАПСЕ

### ВКЛАД ДВУХ ИСТОЧНИКОВ ПУРИНОВ В РЕГУЛЯЦИЮ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

*Балезина О.П., Митева А.С., Гайдуков А.Е.*

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия

**Введение.** Пурины – группа нуклеотидов, включающая АТФ и продукты ее гидролиза – АДФ, АМФ и аденозин. В моторных синапсах АТФ высвобождается в синаптическую щель в качестве комедиатора из холинергических везикул и расщепляется до аденозина [1]. На моторных нервных терминалях млекопитающих выявлены две группы пресинаптических рецепторов - аденозиновые ( $A_1$  и  $A_{2A}$ ) и рецепторы АТФ – P2Y<sub>13</sub> и P2X<sub>7</sub> [1,2]. В обычных условиях работы моторных синапсов преобладает аутоингибирующее секрцию ацетилхолина (АХ) действие как АТФ, так и аденозина, благодаря избирательной активации «тормозных» метаботропных  $A_1$ -аденозиновых и P2Y<sub>13</sub>-пуринорецепторов [2,3]. Однако недавно нами выявлена способность пресинаптических ионотропных P2X<sub>7</sub>-рецепторов АТФ оказывать облегчающее действие на квантовую секрцию АХ, но только при ослаблении обычно преобладающей активности «тормозных» пресинаптических пуринорецепторов [4]. Как обеспечивается избирательная активация и регуляторное действие этого спектра пуринорецепторов – остается малозученным. Одна из возможностей специфической активации разных типов пуринорецепторов – доставка эндогенной АТФ в синаптическую щель не только из синаптических везикул, но и из других источников. Установлена возможность поступления эндогенной АТФ в область моторных синапсов и через белковые каналы, образованные паннексином 1, выявленные в составе мембран аксонов, мышечных и Шванновских клеток [5-8]. Такой источник эндогенной АТФ в синапсах получил название «паннексиновой» АТФ [4,6]. Недавно мы впервые показали, что избирательное устранение «паннексиновой» АТФ в моторных синапсах мышей (путем блокирования паннексина 1) никак не меняет картину вызванной секрции АХ в моторных синапсах, однако при этом не наблюдается потенцирования вызванного выброса квантов АХ в ответ на избирательную блокаду «тормозных»  $A_1$ - и P2Y<sub>13</sub>-пуринорецепторов [4,9]. Как будет меняться квантовая секрция АХ и модулирующая её активность пуринорецепторов при избирательном выключении везикулярного источника АТФ в моторных синапсах – оставалось не изученным. В связи с этим, целью

нашей работы было сопоставить изменения квантовой секреции АХ при избирательном блокировании везикулярного источника синаптической АТФ при сохранении или выключении «паннексиновой» АТФ, с целью оценить избирательный вклад данных источников АТФ в моторных синапсах в пуринергическую регуляцию нервно-мышечной передачи млекопитающих.

**Методика.** Эксперименты проводили при температуре 22-24°C на изолированных нервно-мышечных препаратах (*m. diaphragma–n. phrenicus*) диафрагмы взрослых мышей дикого типа (WT – линия C57/B16) и мышей, нокаутных по гену паннексина 1 (*Panx1<sup>-/-</sup>*) [10]. С помощью традиционной микроэлектродной техники проводили внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных мультиквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП). Перед регистрацией вызванных стимуляцией нерва (50 сверхпороговых стимулов длительностью 0.08-0.1 мс с частотой 50 Гц) ПКП мышечные волокна частично рассекали для предотвращения их сокращения. Сигналы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems), с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card) с интерфейсом PowerGraph 6.0 и записывали их на жесткий диск компьютера. В контроле регистрировали МПКП и ПКП от 5 и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, и далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40-60 мин. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов, в каждой сравниваемой группе – данные от не менее чем 15 синапсов. Первичный анализ данных осуществляли в программе MiniAnalysis (Synaptosoft) вручную, без фильтрования и использования шаблонов обсчета. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 6.0. Сравнению подвергали мембранный потенциал мышечных волокон, амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП. При расчёте квантового состава ПКП производили корректировку амплитуд ПКП в залпе на нелинейную сумму, затем делили полученное значение на среднюю амплитуду МПКП, зарегистрированных в этом же синапсе. С помощью теста Д’Агостино-Пирсона оценивали нормальность распределения значений параметров в выборках. В случае нормально-распределенных величин мембранного потенциала, амплитуд МПКП и показателей временного хода МПКП и ПКП применяли t-критерий Стьюдента, при отличии распределения от нормального – критерий Манна-Уитни. Сравнение амплитуд и квантового состава ПКП в залпах проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с последующим применением апостериорного критерия Тюки. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, уровень значимости  $p = 0.05$ .



**Результаты и обсуждение.** Проведенный нами ранее ряд исследований показал, что у нервно-мышечных синапсов диафрагмы мышцы пуринаргические влияния на квантовую секрецию АХ, традиционно приписываемые действию везикулярного источника АТФ и набору соответствующих рецепторов, изменяются, если исключить участие другого источника эндогенной АТФ в этих синапсах, «паннексиновой» АТФ, поступающей в область синапсов по каналам, образованным паннексином 1 из околосинаптических клеточных источников [4,9]. Устранение у мышей доступа «паннексиновой» АТФ к синапсам, достигавшееся фармакологической блокадой паннексонов или за счет нокаута гена паннексина 1, не меняло картину вызванной квантовой секреции АХ в моторных синапсах. Однако, при этом исчезала способность моторных синапсов развивать потенцирование вызванного выброса АХ в ответ на блокаду «тормозных» пуринарецепторов, активируемых везикулярной АТФ и подавляющих секрецию АХ [4,9]. Для объяснения этого феномена мы предположили, что регуляторная активность везикулярной АТФ – преимущественно тормозная, и дополнена вкладом «паннексиновой» АТФ, которая может быть ответственна за развитие и поддержание усиления вызванного выброса квантов АХ в моторных синапсах, при исключении (или ослаблении) тормозных влияний на секрецию АХ со стороны везикулярной АТФ. Для проверки этой гипотезы в данной работе в качестве первого шага анализировали изменения паттерна ритмической активности синапсов диафрагмы мышцы в условиях избирательного выключения везикулярного источника АТФ. Клодронат (10 мкМ), ингибитор везикулярного транспортера АТФ [11], не оказывал статистически значимых воздействий на амплитудно-временные параметры и частоту спонтанных МПКП ( $p > 0.05$ ). Однако в присутствии клодроната амплитуда ПКП в залпе значительно возрастала за счет единообразного прироста их квантового состава по всему ходу залпа, начиная с первого ПКП – в среднем на 25-30% ( $p < 0.05$ ). Такой характер облегчения квантовой секреции АХ повторяет паттерн потенциации залпового вызванного выброса АХ за счёт возрастания квантового состава всех ПКП в залпе, вызываемого подавлением «тормозных» А<sub>1</sub>- или P2Y<sub>13</sub>-рецепторов, а также – картину потенциации вызванного залпового выброса АХ вследствие вовлечения в регуляцию нервно-мышечной передачи пресинаптических потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа при избирательной активации ионотропных P2X<sub>7</sub>-пуринарецепторов [4,9]. Мы исследовали, сохранятся ли клодронат-индуцированный прирост квантового состава ПКП в случае предварительного блокирования L-типа кальциевых каналов нитрендипином (1 мкМ) или P2X<sub>7</sub>-рецепторов их селективным блокатором А740003 (1 мкМ). Оба блокатора (сами по себе не влиявшие на амплитуду и квантовый состав ПКП) полностью предотвратили

прирост амплитуды и квантового состава ПКП, начиная с первого ПКП в залпе, вызываемый клондронатом в синапсах мышей WT. Полученные данные позволяют предположить, что при избирательном исключении везикулярного источника АТФ из пуринергической регуляции квантовой секреции АХ в первую очередь прекращается активность именно «тормозных» пресинаптических рецепторов  $A_1$  и  $P2Y_{13}$ . При этом другие пуринорецепторы –  $P2X_7$  – становятся способными осуществлять потенцирование быстрой синхронной мультиквантовой секреции АХ, которое проявляется в виде устойчивого возрастания квантового состава ПКП в ритмических залпах. Мы предположили, что потенцирование квантовой секреции АХ с участием  $P2X_7$ -рецепторов обеспечивается «паннексиновой» АТФ в синапсах, призванной избирательно обеспечивать активацию  $P2X_7$ -пуринорецепторов, облегчающих секрецию АХ, и не участвующей при этом в поддержании активности пуринорецепторов, тормозящих квантовую секрецию АХ (которые избирательно активируются везикулярной АТФ).

Блокада «паннексиновой» АТФ, в дополнение к уже существующему в синапсах ингибированию везикулярной АТФ, должна была бы прекратить избирательную поддержку активности  $P2X_7$ -рецепторов и терминировать опосредованный этими рецепторами пресинаптический сигнальный путь, обеспечивающий возрастание квантового состава ПКП при ритмической вызванной активности в моторных синапсах мышцы.

Для проверки этого предположения в последней серии экспериментов регистрацию залповой активности моторных синапсов проводили в условиях тотальной блокады синаптической эндогенной АТФ – не только везикулярной, но и «паннексиновой». В этой серии экспериментов использовали нервно-мышечные препараты мышей с нокаутом гена паннексина 1 ( $Panx1^{-/-}$ ), у которых отсутствуют паннексоны и возможность обеспечивать через них выход из клеток эндогенной «паннексиновой» АТФ. В моторных синапсах диафрагмы мышей  $Panx1^{-/-}$  характер залпа ПКП не отличается от такового у синапсов мышей WT [4,9,10]. В отличие от потенцирующего вызванную секрецию АХ действия клондроната (10 мкМ) в моторных синапсах WT, этот ингибитор везикулярного транспорта АТФ в моторных синапсах линии мышей  $Panx1^{-/-}$  оказался неспособен увеличивать квантовый состав ПКП в условиях кратковременной вызванной залповой активности моторных синапсов мышей  $Panx1^{-/-}$  ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, при одновременном дуальном выключении влияний «паннексиновой» и везикулярной АТФ удалось окончательно подтвердить, что именно и только «паннексиновая» АТФ призвана вызывать усиление квантовой секреции АХ, благодаря способности избирательно активировать определенный тип потенцирующих

вызванный выброс АХ пуринорецепторов – P2X7. В то же время, мы впервые показали, что основной источник эндогенной АТФ в синапсах – везикулярная (нейрогенная) АТФ – не участвует в стимуляции пуринорецепторов, усиливающих квантовую секрецию АХ и действует исключительно путем активации тормозных пресинаптических метаболитных пуринорецепторов, подавляющих вызванный выброс АХ.

Каким именно образом два разных источника АТФ, сосуществующих в синапсах, способны преимущественно активировать определенные типы пресинаптических пуринорецепторов – вопрос, требующий отдельного изучения. В любом случае, открытое нами явление потенцирования вызванного выброса АХ не за счет везикулярной, а «паннексиновой» АТФ, может иметь важное физиологическое значение. В случае дефицита везикулярных источников АХ и АТФ, снижение концентрации АХ в синаптической щели может быть скомпенсировано, благодаря сохраняющейся независимой «паннексиновой» АТФ и её способности избирательно активировать P2X7-рецепторы, запускающие в этих условиях специфический механизм усиления квантовой секреции АХ с участием L-типа кальциевых каналов [4,9].

**Закключение.** Проведенные нами исследования впервые показали, что активация пресинаптических пуринорецепторов, тормозящих либо облегчающих секрецию АХ, происходит при участии двух независимых источников эндогенной АТФ в синапсах – везикулярной АТФ, высвобождаемой при экзоцитозе синаптических везикул, и «паннексиновой» АТФ, поступающей в синапс по паннексонам из околосоинаптических клеточных источников. Используемые нами приемы избирательного выключения каждого из источников АТФ по отдельности, а также их совместного выключения позволило установить, что при залповой активности моторных синапсов функционируют оба источника: и регуляторный контур, тормозящий секрецию АХ с участием везикулярной АТФ, и второй, независимый и ранее не известный регуляторный контур, использующий «паннексиновую» АТФ для усиления и поддержания секреции АХ. Действие этих влияющих на секрецию АХ контуров противоположно направлено, но функционально сопряжено, и их относительный вклад в регуляцию секреции АХ может меняться, в зависимости от состояния соответствующих источников АТФ.

В заключение отметим, что открытие двух разных по генезу и влияниям на квантовую секрецию АХ источников эндогенной АТФ в моторных синапсах меняет традиционные представления о возможностях пуринергической регуляции в моторных синапсах и заслуживает дальнейших более детальных экспериментальных исследований.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300071-8.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Cunha R., Burnstock G., Arnett T.R., Orriss I.R.* // *Purinergic Signal.* 2013. 9(4): 541-72.
2. *Cunha R.A.* // *J. Neurochem.* 2016. 139(6): 1019-55.
3. *Guarracino J.F., Cinalli A.R., Fernández V. et al.* // *Neurosci.* 2016. 326: 31-44.
4. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P.* // *Purinergic Signal.* 2018. 14(4): 459-69.
5. *Dahl G.* // *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2015. 370(1672): 20140191.
6. *Riquelme M.A., Cea L.A., Vega J.L. et al.* // *Neuropharmacol.* 2013. 75: 594-603.
7. *Cea L.A., Riquelme M.A., Vargas A.A. et al.* // *Front. Physiol.* 2014. 5: 139.
8. *Wei Z.-Y., Qu H.-L., Dai Y.-J. et al.* // *Neural Regen. Res.* 2021. 16(5): 899-904.
9. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2017. 11: 311-20.
10. *Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2021. 15: 378-86.
11. *Hasuzawa N., Moriyama S., Moriyama Y., Nomura M.* // *Biochem. Biophys. Acta. Biomembr.* 2020. 1862(12): 183408.

## ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ ПРОДОМЕНОМ BDNF В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

*Гайдуков А.Е., Молчанова А.И.*

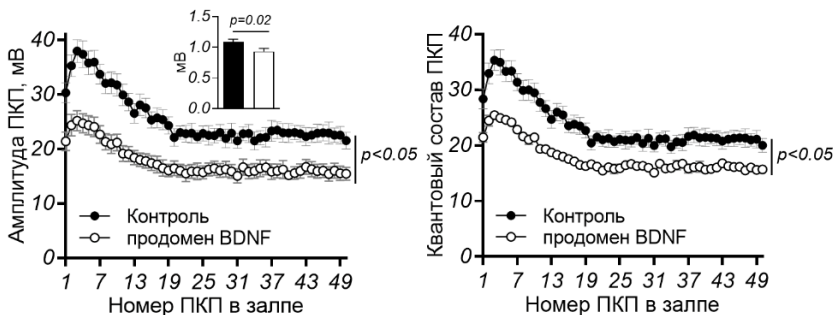
Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия

**Введение.** Нейротрофин мозга (BDNF) – хорошо известный регулятор нейрогенеза модулятор передачи сигнала в синапсах ЦНС. Наличие BDNF и рецепторов (TrkB и p75), на которые нейротрофин может принципиально действовать, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих [1]. BDNF считается одним из главных миокинов, который способен высвобождаться из мышечных волокон как ретроградный мессенджер [2]. Синаптические эффекты BDNF не могут трактоваться однозначно без учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF – продомена BDNF, чья сигнальная роль которого практически не изучена в моторных синапсах. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [3]. Мы установили, что продомен BDNF оказывает действие, полностью противоположное эффектам зрелого нейротрофина – снижает частоту и уменьшает амплитуду одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), а также снижает амплитуду и квантовый состав многоквантовых ПКП в коротких ритмических залпах.

Тормозное действие продомена BDNF реализуется за счет  $\rho 75$ -опосредуемого запуска Rho-киназного сигнального каскада, направленного на стимулирование калиевых каналов GIRK [4]. Активация GIRK требует взаимодействия  $\beta\gamma$ -субъединиц  $G_i$ -белков с этими каналами. В моторных синапсах млекопитающих наличием целый ансамбль пресинаптических метаболитических рецепторов, сопряженных с  $G_i$ -белками – мускариновых M2-рецепторов, аденозиновых  $A_1$ -рецепторов и P2Y<sub>13</sub>-пуринорецепторов. Необходимо было установить, какие именно из них вовлечены в реализацию тормозного действия продомена BDNF на нервно-мышечную передачу?

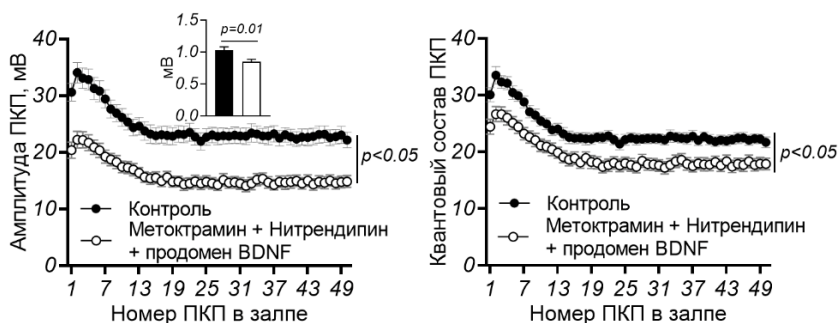
**Методика.** Объектом исследования были нервно-мышечные препараты (*m. diaphragma-n. phrenicus*) диафрагмы взрослых мышей линии C57/Bl6 обоих полов. Регистрацию спонтанной секреции квантов АХ (МПКП) и быстрой синхронной многоквантовой секреции АХ (ПКП) проводили с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Перед регистрацией вызванной активности (при стимуляции нерва с частотой 50 Гц в течение 1 с стимулами длительностью 0.08-0.1 мс) для предотвращения сокращения мышечных волокон их частично рассекали. Синаптическую активность регистрировали с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems) и аналого-цифровой преобразователь E-154 (L-Card) с интерфейсом PowerGraph 6.0. Анализ данных проводили в программе MiniAnalysis (Synptosoft) с последующей статистической обработкой в программе GraphPad Prism 8. Не менее трех нервно-мышечных препаратов использовали в каждой серии экспериментов. В контроле регистрировали активность не менее 5 разных синапсов, после чего в перфузионный раствор добавляли определенные фармакологические агенты, и затем регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40-60 мин. Анализировали изменения мембранного потенциала мышечных волокон, амплитудно-временные характеристики МПКП и ПКП. С использованием корректировки амплитуд ПКП на нелинейную сумму проводили расчёт квантового состава ПКП. Нормальность распределения значений параметров в выборках оценивали с использованием Д'Агостино-Пирсона. Применяли t-критерий Стьюдента при сравнении нормально распределенных величин МПКП и ПКП, в ином случае – критерий Манна-Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки применяли при сравнении изменений амплитуд и квантового состава ПКП в коротких залпах. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, уровень значимости  $p = 0.05$ .

**Результаты.** В первой серии экспериментов мы подтвердили полученные нами ранее данные [4] о дуальном тормозном действии продомена BDNF (1 нМ) в отношении квантовой секреции АХ в зрелых моторных синапсах мыши – за счет снижения размера квантов АХ (что отражается в сочетанном снижении амплитуд МПКП и ПКП) и уменьшении квантового состава всех ПКП в коротком залпе (рис. 1).



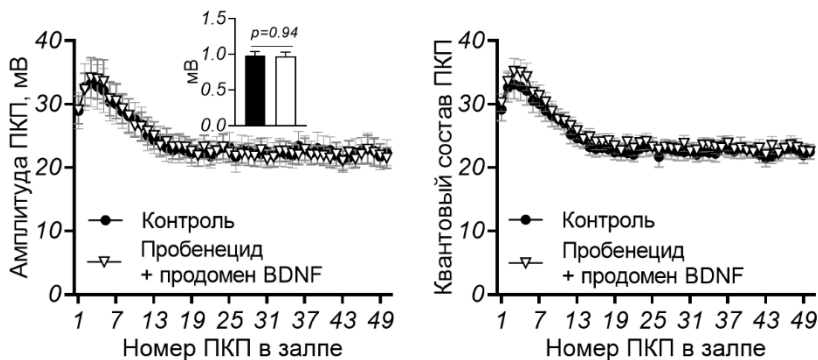
**Рис. 1.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле (n = 16) и под действием продомена BDNF (n = 16). На врезке – амплитуды МПКП.

Далее мы проверяли возможную роль активности мускариновых M2-рецепторов в качестве коактиватора GIRK при действии продомена BDNF. Сам по себе ингибитор M2-рецепторов метоктрамин (0.1 мкМ) вызывал равномерное увеличение амплитуд и квантового состава каждого ПКП в залпе, что могло свидетельствовать о вовлечении в регуляцию выброса квантов АХ Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа [5]. Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса полностью предотвращалось под действием блокатора этого типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипина (1 мкМ), который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах. В присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию АХ (рис. 2).



**Рис. 2.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле (n = 20) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора M2-рецепторов метоктрамина (0.1 мкМ) и блокатора L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипина (1 мкМ) (n = 29). На врезке – амплитуды МПКП.

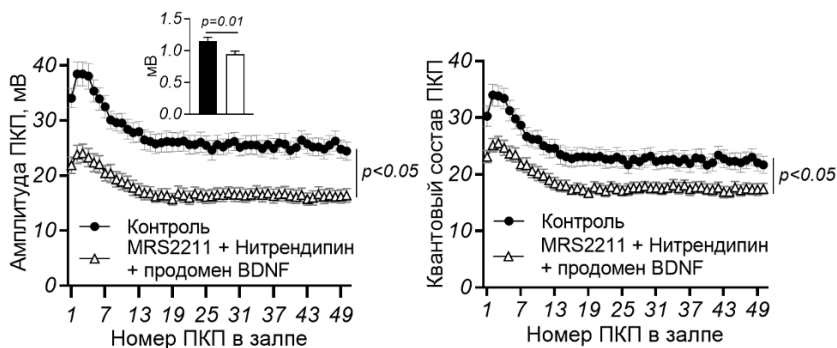
Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-рецепторы вовлечены в негативную регуляцию активности пресинаптических Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа, обеспечивая их «замаскированное» состояние в нормальных условиях работы моторных синапсов, а во-вторых, M2-рецепторы не вовлечены в стимулирование GIRK под действием продомена BDNF. Ранее мы показали, что тормозное влияние на вызванный выброс АХ пуринорецепторов (A<sub>1</sub> и P2Y<sub>13</sub>) требует функционирования каналов, образованных паннексином 1 (паннексонов), в качестве дополнительному к везикулярному источнику синаптической АТФ [6]. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина1, и имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [7], продомен BDNF утрачивал способность ее угнетать [4]. Недавно мы выявили, что фармакологическое блокирование паннексонов пробенецидом (1 мМ) не приводит к изменениям вызванной секреции АХ в моторных синапсах мышей дикого типа [7]. Однако, как и в нервно-мышечных синапсах нокаутных по гену паннексина 1 мышей, при заблокированных пробенецидом паннексонах в моторных синапсах мышей дикого типа продомен BDNF перестал уменьшать амплитуды МПКП и ПКП и снижать квантовый состав ПКП в залпах (рис. 3).



**Рис. 3.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле (n = 19) и под действием продомена BDNF в присутствии блокатора паннексина 1 пробенецида (1 мМ) (n = 24, p > 0.05). На врезке – амплитуды МПКП.

Эти данные говорят о том, что для вовлечения GIRK в регуляцию квантовой секреции АХ в моторных синапсах под действием продомена BDNF необходимо адекватное функционирование компонентов пуринергической модулирующей системы. Оставалось выяснить, эндогенная активация каких пуринорецепторов – P2Y<sub>13</sub> или A<sub>1</sub> – в условиях залповой активности моторных синапсов обеспечивает

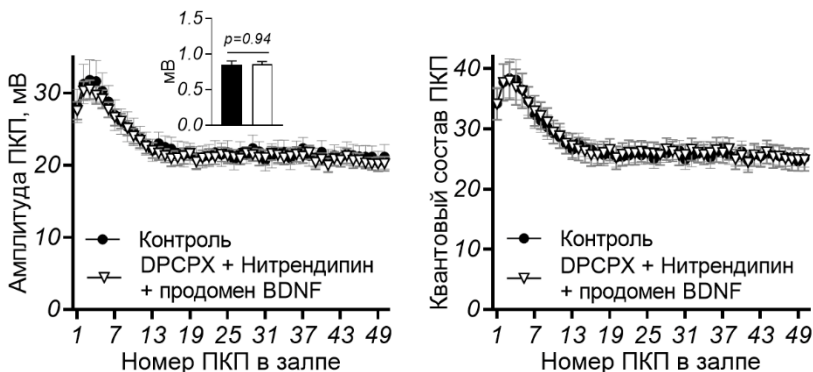
реализацию тормозного действия продомена BDNF? Нами было установлено ранее, что ингибирование P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) приводит к равномерному увеличению амплитуд ПКП по всему ходу коротких залпов – за счет возрастания квантового состава ПКП [6]. В ходе настоящего исследования мы установили, что активность P2Y13-рецепторов, как и мускариновых M2-рецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ кальциевых каналов L-типа – потенцирующее действие MRS2211 предотвращалось нитрендипином. Однако продомен BDNF при ингибировании P2Y13-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином кальциевых каналов L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ (рис. 4). Таким образом, мы убедились, что, несмотря на присутствие в моторных синапсах мыши P2Y13-рецепторов, их активность и физиологическую значимость как негативных регуляторов выброса АХ, они не сопряжены с активацией GIRK и комплексным торможением секреции АХ под влиянием продомена BDNF.



**Рис. 4.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле (n = 17) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) и блокатора L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипина (1 мкМ) (n = 19). На врезке – амплитуды МПКП.

Известно, что A<sub>1</sub>-рецепторы, благодаря их активации эндогенным аденозином, тормозят квантовую секрецию АХ и способствуют «маскированию» активности Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа [5,6]. В данной работе негативное действие продомена BDNF в отношении квантовой секреции АХ полностью предотвращалось при блокировании A<sub>1</sub>-рецепторов DPCPX (100 нМ) в присутствии нитрендипина (1 мкМ) – значения амплитуд МПКП и ПКП и квантового состава ПКП в коротких залпах статистически значимо не отличались от таковых в контроле (рис. 5).





**Рис. 5.** Изменение амплитуд и квантового состава ПКП в контроле (n = 16) и под действием продомена BDNF в присутствии ингибитора A<sub>1</sub>-рецепторов DPCPX (100 нМ) и блокатора L-типа Ca<sup>2+</sup>-каналов нитрендипина (1 мкМ) (n = 22, p > 0.05). На врезке – амплитуды МПКП.

**Закключение.** Проведенные нами исследования впервые показали, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых A<sub>1</sub>-рецепторов, давно известных в качестве тормозящих секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих, необходима для реализации комплексного механизма торможения секреции АХ под действием продомена BDNF. Предотвращение активации только этих пуринорецепторов – за счет их прямого ингибирования или непрямого снижения их активности (за счет фармакологического или генетического «выключения» паннексинового источника синаптических пуринов) – устраняет негативное влияние продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ в моторных синапсах мыши.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта 22-25-00111.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Garcia N., Tomàs M., Santafe M.M. et al. // J. Peripher. Nerv. Syst. 2010. 15(1): 40-9.
2. Gaydukov A., Bogacheva P., Tarasova E. et al. // Cells. 201. 8: 762.
3. Kojima M., Matsui K., Mizui T. // Cell Tissue Res. 2019. 377(1): 73-9.
4. Bogacheva P.O., Molchanova A.I., Pravdivceva E.S. et al. // Front. Cell. Neurosci. 2022. 16: 866802.
5. Tarasova E, Miteva A, Gaidukov A, Balezina O. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2015. 15: 318-28.
6. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2017. 11: 311-20.
7. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2021. 15: 378-86.

# КО-ТРАНСМИССИЯ КАК ФАКТОР СИНАПТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА

Маломуж А.И.<sup>1,2</sup>, Федоров Н.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,  
Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский национальный исследовательский технический университет  
им. А.Н. Туполева, Казань, Россия

**Введение.** В последнее время в нейрофизиологии всё чаще стал использоваться термин «синаптический гомеостаз», который в широком смысле подразумевает наличие в межклеточном контакте сигнальных путей, направленных на поддержание возбудимости (работоспособности) синапса путем регуляции синаптической активности в зависимости от изменения паттерна стимуляции [1]. Данный феномен принято рассматривать в аспекте функционирования ЦНС, где ему отводится роль стабилизатора нейронных сетей, которые требуют непрерывного ремоделирования, чтобы приспособиться к изменениям, зависящим от активности и/или роста. В частности, это касается как раз функционирования мозга в состоянии сна и бодрствования организма [2].

Немного позже феномен синаптического гомеостаза стал рассматриваться и в аспекте функционирования синапсов периферической нервной системы, и в частности, контактов между мотонейроном и скелетным мышечным волокном [3]. Нервно-мышечное соединение является, пожалуй, одним из наиболее изученных в настоящее время синапсов [4]. В качестве внеклеточных сигнальных молекул, участвующих в осуществлении синаптического гомеостаза, рассматривают секретируемые белки, которые инициируют и/или регулируют морфофункциональные особенности пре- и постсинаптических областей межклеточного контакта. В нервно-мышечном синапсе это агрин, белки семейства *Wnts*, белки внеклеточного матрикса и т.д. [3]. Однако, в аспекте поддержания синаптического гомеостаза ни в синапсах ЦНС, ни в периферических контактах, до сих пор не рассматривалась роль таких сигнальных молекул, как ко-медиаторы.

Анализ данных литературы, а также собственных данных, полученных при изучении функционирования нервно-мышечного синапса, позволил сформулировать гипотезу о том, что ко-медиаторы могут рассматриваться в качестве факторов синаптического гомеостаза, по крайней мере, в периферическом холинергическом синапсе. Основные предпосылки и косвенные свидетельства этому представлены далее.

Ко-трансмиссия (ко-медиация). Согласно современной концепции, ко-медиаторы – это синаптически активные сигнальные молекулы, которые выделяются вместе с основным нейромедиатором и способны оказывать свой собственный эффект на клетки-мишени, регулировать

высвобождение основного медиатора и/или модулировать физиологический ответ последнего в воспринимающей клетке [5,6]. В периферическом холинергическом синапсе уже доказано, что в качестве ко-медиатора ацетилхолина выступает АТФ [7] и глутамат [8].

**АТФ.** Поскольку сигнальная функция АТФ в нервно-мышечном синапсе исследуется с 1975 г. [9], то в отношении физиологической роли данного нуклеозидтрифосфата получено больше всего данных. Так, в частности показано, что АТФ, активируя разные подтипы рецепторов, модулирует экспрессию генов, кодирующих ацетилхолинэстеразу и ацетилхолиновые рецепторы, а также регулирует агрегацию последних в области синапса [4]. При этом выявлен механизм угнетающего модуляторного действия АТФ на процессы везикулярного (квантового) и тонического (неквантового) выделения ацетилхолина из двигательного нервного окончания [7,10].

**Глутаминовая кислота (глутамат).** Для этой аминокислоты в нервно-мышечном синапсе также получены доказательства совместного с ацетилхолином выделения и обнаружен спектр глутаматных рецепторов, который варьирует от объекта к объекту и в процессе онтогенеза [8]. У половозрелых млекопитающих продемонстрировано наличие АМПА и НМДА рецепторов. Показано, что глутамат значимо не влияет на процессы квантового выделения ацетилхолина, однако оказывает выраженное угнетающее действие на его неквантовую секрецию [11].

**N-ацетил-аспартилглутамат (NAAG).** Данный нейропептид является самым распространённым нейропептидом в нервной системе млекопитающих [12]. Получены веские доказательства того, что NAAG способен выделяться из двигательного нервного окончания в качестве ко-медиатора ацетилхолина и гидролизироваться в синаптической щели, образуя глутамат [13-15]. Именно образованием молекул глутамата объясняется способность дипептида снижать уровень неквантового выделяемого ацетилхолина [15].

**Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК).** Сигнальная функция этой аминокислоты до недавнего времени рассматривалась исключительно в аспекте функционирования синапсов в ЦНС. Однако, данные последних лет свидетельствуют о том, что эта аминокислота играет определенную синаптическую роль и в периферических межклеточных контактах, и в холинергическом нервно-мышечном контакте, в частности [16]. И если в этом периферическом контакте на настоящий момент имеются лишь косвенные данные о совместном выделении ГАМК и ацетилхолина при стимуляции двигательного нерва [17], то для холинергических синапсов ЦНС такая форма ко-медиации уже доказанный факт [18,19]. Анализируя синаптическую функцию ГАМК в нервно-мышечном синапсе, было установлено, что аминокислота угнетает как процесс вызванной квантовой секреции ацетилхолина, так и уровень его неквантового выделения [20].

**Заключение.** Именно значительный угнетающий эффект ко-медиаторов на процесс некантового выделения ацетилхолина из двигательного нервного окончания и свидетельствует в пользу высказанной гипотезы о ко-трансмиссии как факторе синаптического гомеостаза. Дело в том, что в отсутствии нервной импульсации ацетилхолин выделяется по большей части некантовым тоническим способом [4,21]. При этом концентрация медиатора в щели составляет десятки нмоль/л [21]. При наступлении периода стимуляционной активности, когда ацетилхолин выделяется достаточно активно именно везикулярным способом, концентрация медиатора в межклеточном пространстве может достигать миллимолярного диапазона. И выделяющиеся при этом ко-медиаторы не только регулируют процесс передачи возбуждения (модулируя кантовое выделение), но и угнетают процесс некантовой секреции, тем самым экономя ацетилхолин, необходимый для дальнейшей передачи возбуждения. По окончании эпизода интенсивного выделения кантов, угнетающее действие ко-медиаторов прекращается и некантовое выделение ацетилхолина восстанавливается до нормального/контрольного уровня.

Таким образом, в синапсе: (i) поддерживаются условия для реализации фазного выделения медиатора, необходимого для передачи возбуждения; (ii) имеет место экономия выделяющегося медиатора для обеспечения более длительной передачи возбуждения; и (iii) поддерживается базальный уровень медиатора не ниже определенной концентрации без использования сложноорганизованных синаптических везикул. Достижение такого гомеостаза в уровне ацетилхолина в синаптической щели крайне необходимо для нормального функционирования синапса, поскольку неоднократно доказана так называемая «нейротрофическая» роль тонически выделяемого медиатора для иннервируемой клетки [22,23].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00330, <https://rscf.ru/project/23-25-00330/>

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Macleod G.T., Zinsmaier K.E.* // *Neuron*. 2006. 52(4): 569-71.
2. *Tononi G., Cirelli C.* // *Neuron*. 2014. 81(1): 12-34.
3. *Takamori M.* // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. 18(4): 896.
4. *Маломуж А.И., Никольский Е.Е.* // *Биологические мембраны*. 2018. 35(3): 169-85.
5. *Burnstock G.* // *Curr. Opin. Pharmacol*. 2004. 4(1): 47-52.
6. *Gutierrez R.* *Co-Existence and Co-Release of Classical Neurotransmitters*. 2009. New York: Springer, 275 p.
7. *Burnstock G.* // *Physiol. Rev*. 2007. 87(2): 659-797.
8. *Colombo M.N., Francolini M.* // *Cells*. 2019. 8(9): 996.

9. *Silinsky E.M.* // J. Physiol. 1975. 247(1): 145-62.
10. *Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Vyskočil F.* // Neurosci. Res. 2011. 71(3): 219-25.
11. *Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E. et al.* // J. Neurochem. 2003. 85(1): 206-13.
12. *Neale J.H., Bzdega T., Wroblewska B.* // J. Neurochem. 2000. 75(2): 443-52.
13. *Berger U.V., Carter R.E., Coyle J.T.* // Neuroscience. 1995. 64(4): 847-50.
14. *Walder K.K., Ryan S.B., Bzdega T. et al.* // Eur. J. Neurosci. 2013. 237(1): 118-29.
15. *Malomouzh A.I., Nikolsky E.E., Lieberman E.M. et al.* // J. Neurochem. 2005. 94(1): 257-67.
16. *Malomouzh A., Ilyin V., Nikolsky E.* // Amino Acids. 2019. 51(8): 1093-102.
17. *Lenina O., Petrov K., Kovyazina I., Malomouzh A.* // Exp. Physiol. 2019. 104(7): 1004-10.
18. *Granger A.J., Mulder N., Saunders A., Sabatini B.L.* // Neuropharmacology. 2016. 100: 40-6.
19. *Saunders A., Granger A.J., Sabatini B.L.* // Elife. 2015. 4: e06412.
20. *Malomouzh A.I., Petrov K.A., Nurullin L.F., Nikolsky E.E.* // J. Neurochem. 2015. 135(6): 1149-60.
21. *Vyskocil F., Malomouzh A.I., Nikolsky E.E.* // Physiol. Res. 2009. 58(6): 763-84.
22. *Маломуж А.И., Никольский Е.Е.* // Успехи физиологических наук. 2010. 41(2): 27-43.
23. *Cisterna B.A., Vargas A.A., Puebla C. et al.* // Nat. Commun. 2020. 11(1): 1073.

## ЭФФЕКТЫ ПРОНЕЙРОТРОФИНА BDNF И ПРОДОМЕНА BDNF В НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ ТРЕБУЮТ ОБЯЗАТЕЛЬНОГО УЧАСТИЯ РЕЦЕПТОРОВ TRKB И СОРТИЛИНА

*Потапова Д.А., Правдивцева Е.С., Богачева П.О.*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Нейротрофин мозга (BDNF) – ростовой фактор, хорошо известный своей способностью регулировать разнообразные физиологические процессы в нервной системе. В развивающихся нейронах BDNF стимулирует выживание и дифференцировку, а в зрелых нейронах усиливает передачу сигналов и участвует в процессах пластичности, действуя через свои рецепторы TrkB. Как и все нейротрофины, BDNF синтезируется в виде предшественника, proBDNF, содержащего сигнальную последовательность, продомен и зрелый домен. Далее с участием пептидаз происходит расщепление пронеуротрофина до продомена и зрелого BDNF. Зная это, многочисленные и разнообразные синаптические эффекты нейротрофина мозга нельзя однозначно интерпретировать без учета возможного одновременного действия в синапсах, наряду с самим BDNF, и продуктов его созревания.

Относительно недавно была описана возможность самостоятельного сигнального действия proBDNF, а затем и продомена в синапсах ЦНС [1,2]. Про функциональную роль этих продуктов созревания BDNF в нервно-мышечных синапсах практически ничего не известно.

В ходе формирования моторных синапсов в эмбриогенезе, а также после денервации зрелых мышц, происходит повышение экспрессии proBDNF [3], что должно приводить и к возрастанию уровня продомена. Изучение возможного участия proBDNF и продомена BDNF в регуляции секреции медиатора в новообразованных нервно-мышечных синапсах и было целью данного исследования.

**Методика.** Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах длинного разгибателя пальцев (*m. EDL*) взрослых самцов мышей линии BALB/c. Содержание животных соответствовало директиве 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Эвтаназию животных проводили путем быстрой декапитации.

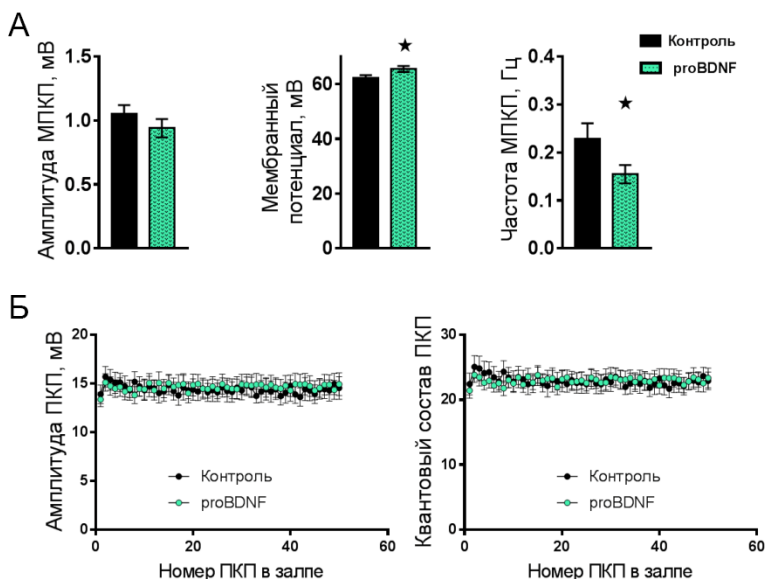
За 11 суток до электрофизиологического эксперимента животным проводили хирургическую операцию по передавливанию малоберцового нерва. Это приводило к последующей регенерации аксонов и формированию заново моторных синапсов с *m. EDL*, находящихся в этот период в функционально ослабленном состоянии.

Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в экспериментальную камеру с полимерной подложкой объемом 5 мл, заполненную оксигенированным (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) раствором Лайли для теплокровных животных. Внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных раздражением нерва потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М КСl (сопротивление кончика микроэлектрода составляло 15-20 МОм). Нерв раздражали короткими пачками сверхпороговых импульсов (50 Гц, 1 с). Для предотвращения сокращений мышечных волокон в ответ на стимуляцию нерва проводили их рассечение. Сигналы регистрировали при помощи усилителя Axoclamp 2B (Axon Instruments, USA) и записывали их с помощью аналого-цифрового преобразователя L-Card E-154 (L-Card, Russia) с интерфейсом Powergraph 3.3.9 (Powergraph, Russia) на жесткий диск компьютера для последующего анализа в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, USA).

В каждой серии использовали нервно-мышечные препараты не менее, чем от 3 животных. Оценивали уровень мембранного потенциала, амплитуду и временные параметры МПКП, а также амплитуду и квантовый состав ПКП, который рассчитывали как отношение средней скорректированной на нелинейную суммацию амплитуды ПКП к средней

амплитуде МПКП. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи критериев Стьюдента и Манна-Уитни, а также двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с использованием программ MS Office Excel и Prism7 (GraphPad, США). Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

**Результаты.** В присутствии proBDNF (1 нМ) наблюдали небольшое, но достоверное повышение мембранного потенциала мышечных волокон на 5% по сравнению с контролем. При этом амплитуда и временной ход МПКП не изменились, но достоверно снизилась на 37% их частота. Параметры ПКП (амплитуда и квантовый состав) при залповой активности синапсов после инкубации с proBDNF не отличались от таковых в контроле (рис. 1).



**Рис. 1.** Изменения спонтанной и вызванной секреции медиатора в присутствии proBDNF (1 нМ). А) влияние proBDNF на параметры МПКП. Б) влияние proBDNF на параметры ПКП.

Важно было понять причину падения и без того исходно крайне низкой частоты МПКП в новообразованных моторных синапсах под действием пронейротрофина. Поскольку еще одним эффектом proBDNF была гиперполяризация мышечных волокон, это могло указывать на развившееся в присутствии пронейротрофина усиление выходящих токов калия. Наиболее вероятными каналами, способными привести к такому

эффекту, являются GIRK – G-белок-связанные каналы входящего выпрямления. Недавно была показана возможность их модуляции при действии нейротрофинов [4].

Блокатор каналов GIRK тертиапинQ (100 нМ) не оказывал собственных эффектов на синаптическую передачу, но в его присутствии proBDNF утратил способность вызывать гиперполяризацию мембраны и снижение частоты МПКП. Это позволяет предполагать участие пресинаптических каналов GIRK в реализации тормозных эффектов proBDNF в новообразованных моторных синапсах, что приводит к подавлению у них частоты секреции квантов ацетилхолина.

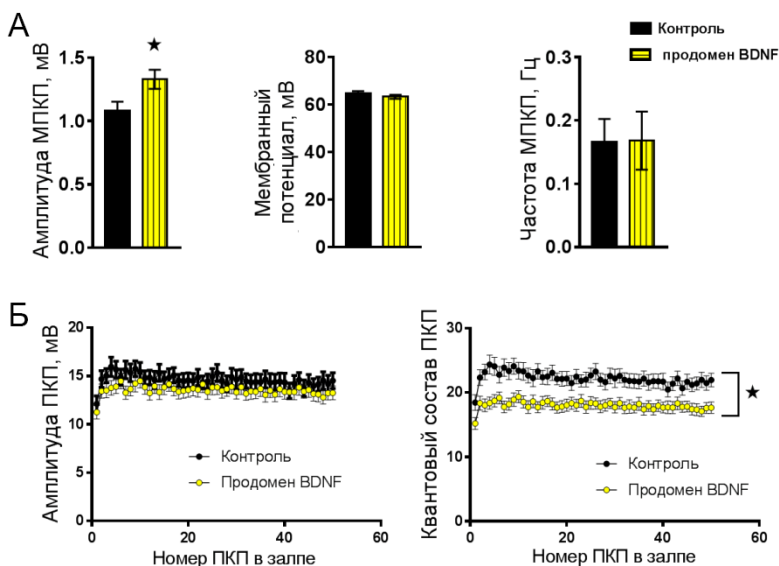
Активация GIRK при действии proBDNF могла происходить путем задействования основного рецептора пронеуротрофинов – p75. Поэтому далее мы использовали ингибитор Rho-GDI сигнального пути, сопряженного с p75 – TAT-Pep5 (1 мкМ). Неожиданно, предварительная инкубация нервно-мышечных препаратов с TAT-Pep5 не предотвратила развития эффектов proBDNF. Таким образом, рецепторы p75, по-видимому, не являются проводниками эффектов пронеуротрофина.

Пронеуротрофины способны связываться также и с рецепторами зрелых форм нейротрофинов – TrkB. Для проверки возможного действия proBDNF через рецепторы TrkB использовали их блокатор, циклотраксин В (1 мкМ). В его присутствии proBDNF полностью утратил способность снижать частоту МПКП и вызывать гиперполяризацию мышечных волокон.

В свете такого неканонического рецепторного действия пронеуротрофина важно было проверить и участие в реализации его эффектов сортилина – важного участника димеризации как TrkB, так и p75 рецепторов. Блокатор сортилина, AF38469 (5 мкМ) сам по себе не оказывал влияния на спонтанную и вызванную секрецию медиатора. Однако в его присутствии proBDNF начал оказывать подавляющее действие на вызванную секрецию: амплитуда и квантовый состав ПКП достоверно снижались на 25%. Действие же proBDNF на спонтанную секрецию при этом не изменилось: наблюдали снижение частоты МПКП и гиперполяризацию мышечных волокон.

Продомен BDNF (1 нМ), как оказалось, также обладал сигнальным действием в новообразованных синапсах. В его присутствии не изменялась частота МПКП или их временные параметры, но достоверно увеличивалась амплитуда МПКП на 30%. Это происходило за счет увеличения размера кванта медиатора, так как предотвращалось везикулярное транспорт ацетилхолина. Что касается вызванной секреции медиатора, то оказалось, что продомен BDNF не влияет на амплитуду ПКП в коротком залпе, но достоверно снижает их квантовый состав на 20% (рис. 2).





**Рис. 2.** Изменения спонтанной и вызванной секреции медиатора в присутствии продомена BDNF (1 нМ). А) влияние продомена на параметры МПКП. Б) влияние продомена на параметры ПКП.

Такой сложный характер влияния продомена BDNF на вызванную секрецию медиатора, очевидно, связан с одновременным развитием двух противоположно направленных эффектов – увеличением размера отдельных квантов ацетилхолина и снижением квантового состава многоквантовых ПКП, что в итоге способствует поддержанию амплитуды ПКП на стабильном уровне.

Несмотря на несхожесть эффектов продомена и proBDNF, провели проверку зависимости действия продомена от работы каналов GIRK. Тertiапин Q никак не повлиял на вызываемые продоменом BDNF увеличение размера кванта и падение квантового состава ПКП.

Уменьшение квантового состава ПКП под действием продомена полностью предотвращалось циклотраксином В (1 мкМ), что показывает необходимость участия TrkB рецепторов в реализации эффектов продомена! Спонтанная же секреция медиатора в присутствии циклотраксина В и продомена изменилась: амплитуда МПКП не увеличивалась, а частота МПКП достоверно снизилась на 38%!

Однако наиболее каноничным для взаимодействия с продоменами нейротрофинов все же является сортилин – как самостоятельный рецептор, так и при димеризации с другими представителями рецепторов нейротрофинов [5]. Действительно, блокатор сортилина AF38469 (5 мкМ) полностью предотвращал влияние продомена BDNF на параметры как спонтанной, так и вызванной секреции медиатора.

Таким образом, мы установили, что в моторных синапсах, находящихся на стадии структурно-функционального созревания в ходе реиннервации мышечных волокон, имеют место собственные регуляторные воздействия как пронеуротрофина, так и продукта созревания зрелого нейротрофина – продомена BDNF, затрагивающие различные параметры квантовой секреции ацетилхолина. При этом оба продукта процессинга BDNF для проявления своих эффектов нуждаются в активации рецепторов TrkB и сортилина, а их действие в целом направлено на стабилизацию вызванной секреции медиатора в функционально ослабленных синапсах.

Работа поддержана грантом РФФ 22-25-00111.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Costa R.O., Perestrello T., Almeida R.D. // Mol. Neurobiol. 2017. 55(4): 2934-51.
2. Mizui T., Ishikawa Y., Kumanogoh H., Kojima M. // Pharmacol. Res. 2016. 105: 93-8.
3. Aby K, Antony R., Eichholz M. et al. // Life Sci. 2021; 286:120067.
4. Coulson E.J., May L.M., Osborne S.L. et al. // J. Neurosci. 2008. 28: 315-24.
5. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E. et al. // Cell. Mol. Neurobiol. 2018. 38: 579-93.

## ИНСУЛИН КАК МОДУЛЯТОР ПЕРЕСТРОЕК В МАКРОКОМПЛЕКСАХ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ ГИППОКАМПА

*Проскура А.Л., Вечкапова С.О., Ратушняк А.С.*

Федеральный исследовательский центр информационных и  
вычислительных технологий, Новосибирск, Россия

**Введение.** Мозг потребляет большое количество кислорода для выработки АТФ, что необходимо для поддержания его клеточного функционального гомеостаза [1]. Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и анион-радикалы супероксида, известные под общим названием активных форм кислорода (АФК), традиционно считаются токсичными побочными продуктами аэробного метаболизма [2].

Основным поставщиком инсулина в мозг выступает поджелудочная железа посредством насыщаемого транспорта [3]. Инсулин связывается со своими рецепторами (ИР) и в периферических тканях, главным образом обеспечивает метаболизм глюкозы и липидов. Считается, что ИР не оказывает существенного прямого влияния на метаболизм глюкозы в нейронах, а участвует в анаэробных реакциях, формировании памяти и выживании нейронов [4]. В гиппокампе он модулирует возбуждающую

глутаматергическую нейротрансдукцию [5]. Нарушение передачи сигналов инсулина вызывает окислительное повреждение нейронов и подвергает мозг риску нейродегенерации [6].

Долговременная потенциация (ДВП) или длительное усиление синаптической эффективности, в гиппокампе контролируется макрокомплексами ионотропных глутаматных рецепторов, в частности, НМДА (N-метил-D-аспартат) и АМПА ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота) типов, которые локализованы на постсинаптической части синапсов [7].

В работе представлен анализ вклада инсулина на межмолекулярные перестройки в макрокомплексах глутаматных рецепторов в течение ДВП с использованием визуальной модели базы данных GeneNet (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer/AMPA.html>) [8].

**Результаты.** Постсинаптическая часть нейронов, в частности, пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа представлена дендритным шипиком, являющимся мультифункциональной и многоуровневой системой контроля глутаматергической нейротрансдукции [9]. АМПА рецепторы (АМПАР) представлены несколькими типами: GluR2-АМПАР – гетеродимеры GluR2 и GluR3 субъединиц (основной тип АМПАР взрослых животных), GluR1-АМПАР содержат субъединицу GluR1 [7].

В зоне синаптического контакта ионотропные глутаматные рецепторы формируют упорядоченные макрокомплексы с белками постсинаптического уплотнения (ПСУ), что обеспечивает межмолекулярные взаимодействия при функционировании синапса [8,9]. Базовая нейротрансдукция сопровождается поддержанием определенной плотности GluR2-АМПАР за счет уравнивания процессов их выведения из зоны синаптического контакта и обратного возвращения из везикулярных компартментов и встраивания на синапсы [10,11]. GluR2-АМПАР обеспечивают изменение потенциала плазматической мембраны, что необходимо, помимо прочих событий, для активации НМДАР и индукции ДВП. В настоящее время считается, что увеличение плотности синаптических АМПАР является ключевым механизмом усиления эффективности синаптической передачи в течение ДВП [11,12].

Индукция ДВП интенсифицирует выведение синаптических GluR2-АМПАР. Этот процесс запускается фосфорилированием субъединицы GluR2 протеинкиназой С (ПКС) [13]. При этом происходит введение в зону синаптического контакта GluR1-АМПАР с фосфорилированными протеинкиназой А (ПКА) субъединицами GluR1 [12]. Закрепление на слотах ПСУ GluR1-АМПАР сопровождается фосфорилированием GluR1, в частности ПКС [8,14]. ПКС активируется диацилглицерином (ДАГ), а ПКА – циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), концентрация которых возрастает после активации НМДАР.

Рецептор инсулина (ИР) (продукт гена INSR) является трансмембранным протеином, относится к классу рецепторных тирозинкиназ и экспрессируется во всех отделах мозга [4].

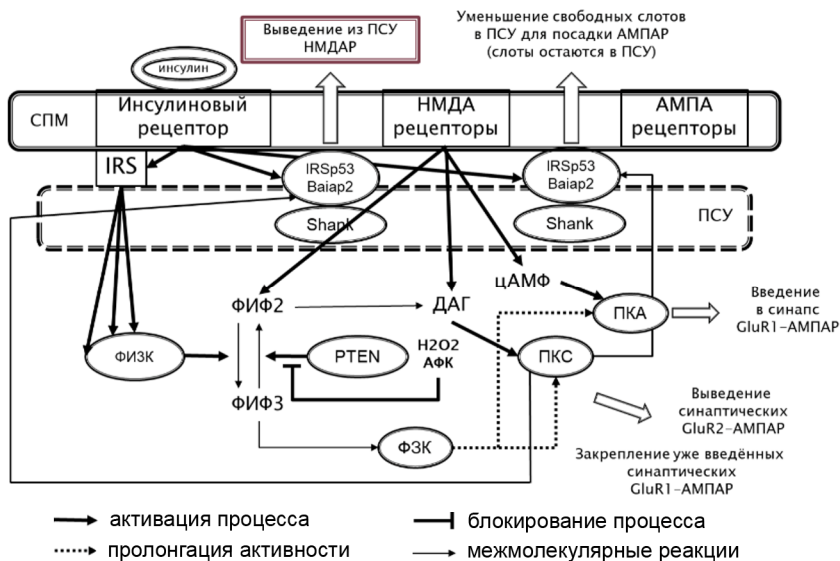
Эффекты инсулина могут реализовываться через несколько сигнальных путей [4]. Считается, что инсулин и его субстрат IRS (insulin receptor substrate) активируют, главным образом, сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК), что приводит к накоплению на мембране пула ФИФ3 (фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат) за счет фосфорилирования 3 позиции в инозитольном кольце – реакция ФИФ2 (фосфатидилинозит-4,5-дифосфат) → ФИФ3 [4,15]. ФИФ3 являются сайтами закрепления ряда белков, в частности, ФЗК – фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы 1 ((PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1)), которая, помимо прочего, пролонгирует активность ПКС и ПКА [16]. Таким образом, ФИФ3 способствуют формированию на плазматической мембране дендритного шипика макрокомплексов белков, что обеспечивает пространственную локализацию протеинкиназ со своими субстратами и их стабильную работу (рис. 1).

Активация ФИЗК-сигнального каскада сопровождается выключением его главного антагониста PTEN – протеинфосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена PTEN (сокр. от англ. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). Это может достигаться как через фосфорилирование PTEN рядом протеинкиназ [17,18], так и ингибированием ее активного центра перекисью водорода и/или АФК [4]. PTEN дефосфорилирует фосфоинозитиды в позиции 3 инозитольного кольца (реакция ФИФ3 → ФИФ2) (рис. 1).

Еще одним субстратом тирозинкиназы ИР является белок Baiar2 (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2), синоним IRSp53 (Insulin receptor substrate protein of 53 kDa) [19]. Этот адаптерный белок вовлечён в регулирование перестроек актинового цитоскелета через малые G-белки (20-23). Baiar2/IRSp53 вовлечен в регулирование синаптической пластичности через НМДАР и белки постсинаптического уплотнения [24] и связан с нейродегенеративными нарушениями [25].

ПКС фосфорилирует IRSp53, способствуя его закреплению на мембране через скаффолд-белки ПСУ в участках, обогащенных ФИФ2 и ФИФ3 [26]. В шипиковых возбуждающих нейронах неокортекса и гиппокампа IRSp53 концентрируется в центре ПСУ [27].

Baiar2/IRSp53 в ПСУ прямо взаимодействует со скаффолд-белками семейства Shank (белок, содержащий SH3 домен и множество анкириновых повторов (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein), снижая число слотов для закрепления вводимых после индукции ДВП АМПАР [24]. Имеются данные, что Baiar2/IRSp53 способствует выведению из ПСУ НМДАР [2,26]. Таким образом, IRSp53 ограничивает количество синаптических глутаматных рецепторов на ПСУ и тем самым влияет на синаптическую пластичность, а не на морфологию дендритов.



**Рис. 1.** Схематичное представление сигнального пути инсулина в дендритных шипиках пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. ПСУ – постсинаптическое уплотнение; СПМ – синаптическая плазматическая мембрана (постсинаптическая часть зоны синаптического контакта дендритного шипика); АМПАР – АМПА рецепторы; АМПА –  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; GluR1 – субъединица 1 типа АМПАР; GluR2 – субъединица 2 типа АМПАР; НМДА – N-метил-D-аспартат; ФИЗК – фосфатидилинозитол-3-киназа; ФИФ2 – фосфатидилинозит-4,5-дифосфат; ФИФ3 – фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат; IRSp53/Baiap2 – субстрат инсулинового рецептора молекулярной массой 53 кДа (Insulin receptor substrate protein of 53 kDa/Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2); IRS – субстрат инсулинового рецептора (insulin receptor substrate); Shank – белок, содержащий SH3 домен и множество анкириновых повторов (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein); PTEN – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, продукт гена PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10); цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ДАГ – диацилглицерин; ПКС – протеинкиназа С; PKA – цАМФ-зависимая протеинкиназа А; ФЗК – фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1 (PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1)); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода; АФК – активные формы кислорода.

Итак, инсулин через свой ИР оказывает влияние на эффективность синаптической нейротрансмиссии. После индукции НМДАР-зависимой ДВП происходит интенсификация процессов выведения GluR2-АМПАР (через ПКС) и введения GluR1-АМПАР (через PKA). Преинкубация с инсулином будет способствовать пролонгации работы ПКС и PKA (через ФЗК), что, казалось бы, должно поддерживать развитие НМДАР-зависимой ДВП. Однако, ПКС и сам ИР будут способствовать

закреплению в ПСУ белков *Vaiar2/IRSp53*, что в корне способно переформатировать макрокомплексы белков в шипиках, способствуя, как выведению синаптических НМДАР, так и ограничению свободных слотов для закрепления вводимых АМПАР (рис. 1).

Кроме того, в присутствии перекиси водорода и/или АФК (например, в ситуации предшествующей значительной синаптической активности) ИР будет запускать накопление на мембране ФИФЗ через ФИЗК-сигнальный каскад, причем, стоит отметить, что этот процесс не зависит напрямую от активности НМДАР [29].

Таким образом несмотря на то, что через ФИЗК-сигнальный путь инсулин может поддерживать развитие НМДАР-зависимой ДВП, его эффект скорее будет оказывать негативное влияние на этот процесс через модулирование межбелковых взаимодействий в макрокомплексах дендритных шипиков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Halliwell B. // J. Neurochem. 2006. 97(6): 1634-58.
2. Pomytkin I.A. // Curr. Neuropharmacol. 2012. 10(4): 311-20.
3. Banks W.A. // Eur. J. Pharmacol. 2004. 490(1-3): 5-12.
4. Помыткин И.А., Красильникова И.А., Пинелус В.Г., Каркищенко Н.Н. // Биомедицина. 2018. 3: 17-34.
5. Zhao F., Siu J.J., Huang W. et al. // Neuroscience. 2019. 411: 237-54.
6. Muller A.P., Haas C.B., Camacho-Pereira J. et al. // Exp Neurol. 2013. 247: 66-72.
7. Wenthold R.J., Petralia R.S., Blahos J., Niedzelski A.S. // J. Neurosci. 1996. 16(6): 1982-9.
8. Проскура А.Л., Малахин И.А., Турнаев И.И. и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. 17: 620-8.
9. Proskura A.L., Ratushnyak A.S., Vechkapova S.O., Zapara T.A. // Studies in computational intelligence. 2018. 736: 186-92.
10. Greger I.H., Esteban J.A. // Curr. Opin. Neurobiol. 2007. 17(3): 289-97.
11. Newpher T.M., Ehlers M.D. // Neuron. 2008. 58: 472-97.
12. Tanaka H., Hirano T. // Cell Rep. 2012. 1: 291-8.
13. Seidenman K.J., Steinberg J.P., Huganir R., Malinow R. // J. Neurosci. 2003. 23(27): 9220-8.
14. Lee H.K., Barbarosie M., Kameyama K. et al. // Nature. 2000. 405(6789): 955-9.
15. Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J. // Trends Biochem Sci. 2011. 36(6): 320-8.
16. Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. 11(1): 9-22.
17. Moulton P.R., Cross A., Santos S.D. et al. // J. Neurosci. 2010. 30: 4088-4101.
18. Al-Khoury A.M., Ma Y., Togo S.H. et al. // J. Biol. Chem. 2005. 280(42): 35195-202.
19. Heung M.Y., Visegrady B., Fütterer K., Machesky L.M. // Eur. J. Cell Biol. 2008. 87(8-9): 699-708.
20. Fujiwara T., Mammoto A., Kim Y., Takai Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. 271(3): 626-9.
21. Disanza A., Mantoani S., Hertzog M. et al. // Nat. Cell Biol. 2006. 8(12): 1337-47.

22. *Disanza A., Bisi S., Winterhoff M. et al.* // EMBO J. 2013. 32(20): 2735-50.
23. *Lim K.B., Bu W., Goh W.I. et al.* // J. Biol. Chem. 2008. 283(29): 20454-72.
24. *Sawallisch C., Berhörster K., Disanza A. et al.* // J. Biol. Chem. 2009. 284(14): 9225-36.
25. *Thomas E.A., Foye P.E., Alvarez C.E. et al.* // Neurosci. Lett. 2001. 309(3): 145-8.
26. *Hori K., Yasuda H., Konno D. et al.* // J. Neurosci. 2005. 25(10): 2670-81.
27. *Burette A.C., Park H., Weinberg R.J.* // J. Comp. Neurol. 2014. 522(9): 2164-78.
28. *Kang J., Park H., Kim E.* // Neuropharmacology. 2016. 100: 27-39.
29. *Проскура А.Л., Вечкапова С.О., Исламова М.Ю., Ратушняк А.С.* // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. 2021. 2: 458-62.

## ОПОСРЕДОВАННОЕ ЧЕРЕЗ КГРП УВЕЛИЧЕНИЕ РАЗМЕРОВ КВАНТОВ АЦЕТИЛХОЛИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ 2-АГ В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

*Тарасова Е.О., Чернышев К.А., Богачева П.О., Базелина О.П.*

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** 2-арахидоноил-глицерол (2-АГ) – один из хорошо известных эндоканнабиноидов, широко представленных в синапсах ЦНС и периферических органах. Он обладает специфической активностью: синтезируясь в постсинаптических структурах, он высвобождается и ретроградно тормозит секрецию медиаторов [1]. Однако в наших работах выявлена неканоническая способность 2-АГ избирательно увеличивать размеры квантов ацетилхолина (АХ), действуя на пресинаптические каннабиноидные рецепторы 1-го типа (CB1) в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц [2]. Такое действие 2-АГ повторяет эффекты кальцитонин-ген родственного пептида (КГРП), который при экзогенной аппликации либо при высвобождении из моторных терминалей оказывает аналогичное потенцирующее действие на амплитуду МПКП, усиливая накачку АХ в везикулы и повышая размер квантов АХ [3,4]. Способность 2-АГ стимулировать выброс нейрогенного КГРП описана недавно в периферических сенсорных ноцицептивных терминалях [5]. В связи с этим, целью данной работы было выявить, может ли и в периферических нервно-мышечных синапсах мышцы 2-АГ приводить к росту размеров квантов АХ, действуя не напрямую, а опосредованно, через стимуляцию выброса КГРП.

**Методика.** Работу проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы (*m. diaphragma*) и диафрагмального нерва (*n. phrenicus*), а также на препаратах длинного разгибателя пальцев (*m. extensor digitorum longus* (*m. EDL*)) и малоберцового нерва (*n. peroneus*)

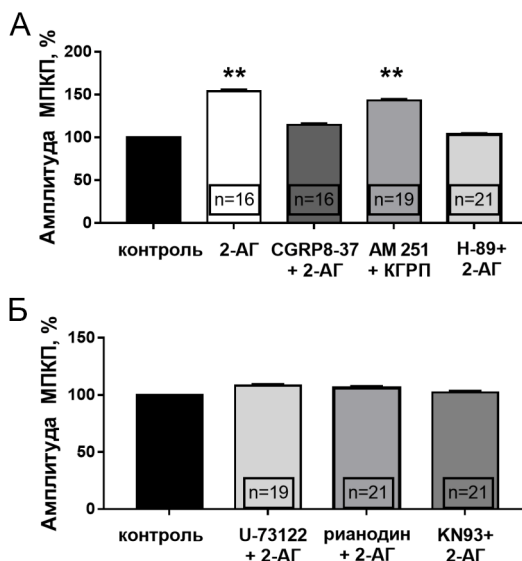
мышы (линия Balb/c) при комнатной температуре. Препарат помещали в камеру объемом 3 мл и перфузировали оксигенированным (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) раствором Лайли (рН 7.2-7.4). Регистрацию миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) осуществляли внутриклеточно с помощью микроэлектродов, заполненных 2.5 М КСl (сопротивление кончика 15 МОм). Сигналы (МПКП) регистрировали при помощи усилителя Axoclamp-2B (Molecular Devices) и записывали их на жесткий диск компьютера с помощью аналого-цифрового преобразователя «L-Card E-154» с интерфейсом «PowerGraph». Полученные данные обрабатывали в программе «MiniAnalysis» (Synptosoft). В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов, у которых регистрировали МПКП от пяти и более синапсов в контроле и целом ряде других синапсов после аппликации веществ (не менее 5). В опытах на m.EDL проводили регистрацию МПКП в покое (контроль), затем на фоне блокатора СВ1-рецепторов АМ 251 (минимум 5 синапсов), после чего стимулировали нерв сверхпороговыми импульсами (30 Гц, 2 мин), и сразу после стимуляции начинали регистрацию МПКП в разных синапсах на протяжении 40-60 минут. Достоверность различий между выборками оценивали по one-way ANOVA или его непараметрическому аналогу – критерию Краскелла-Уоллиса. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (n – количество исследованных синапсов).

**Результаты и обсуждение.** *Анализ эффектов экзогенного 2-АГ.* Ранее нами было обнаружено и подтверждено повторно в данной работе, что экзогенно апплицируемый 2-АГ способен вызывать прирост амплитуды МПКП примерно на 50% без изменения остальных параметров спонтанной секреции квантов АХ в синапсах диафрагмы [2].

Для установления возможной связи между эффектами 2-АГ и КГРП в моторных синапсах мышы, в данной работе мы проводили блокирование КГРП-рецепторов при помощи пептидного фрагмента CGRP<sub>8-37</sub> (1 мкМ). Сам блокатор не вызвал изменений параметров МПКП, однако дальнейшая аппликация на его фоне экзогенного 2-АГ не вызвала увеличения амплитуды МПКП (рис. 1А). Поскольку ранее было показано, что механизм потенцирующего действия КГРП на размеры квантов зависит от активности РКА, в следующей серии проводили предварительное ингибирование РКА при помощи Н-89 (1 мкМ). На фоне Н-89 2-АГ также терял способность вызвать прирост амплитуды МПКП (рис. 1А). Это свидетельствовало о том, что потенцирующее действие 2-АГ на амплитуду МПКП действительно может быть опосредовано действием КГРП в моторных синапсах мышы. Обратная процедура – предварительная блокада СВ1-рецепторов с помощью их инверсного агониста АМ 251 (1 мкМ) с последующей аппликацией КГРП (1 мкМ) – не влияла на способность КГРП увеличивать амплитуду МПКП (рис. 1А).



Исходя из полученных данных, можно предположить, что действие 2-АГ в синапсах заключается в обеспечении выброса эндогенного КГРП, а уже его пресинаптическое действие приводит к увеличению амплитуды МПКП путем усиления накачки АХ в везикулы (с участием РКА).



**Рис. 1.** А. Амплитуда МПКП в контроле и на фоне двухчасовой аппликации 2-АГ (1 мкМ) ( $p = 0.0029$ ), CGRP<sub>8-37</sub> (1 мкМ) и 2-АГ ( $p = 0.1718$ ), AM 251 (1 мкМ) и КГРП (1 мкМ) ( $p = 0.0001$ ) и 2-АГ ( $p = 0.9232$ ) Б. Амплитуда МПКП в контроле и на фоне двухчасовой аппликации U-73122 (5 мкМ) и 2-АГ (1 мкМ) ( $p = 0.6823$ ), рианодина и 2-АГ ( $p = 0.8247$ ), а также KN93 (3 мкМ) и 2-АГ ( $p = 0.9774$ ). Средние значения амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). \*\* –  $p < 0.01$

Известно, что эндогенный КГРП запасается в составе электронно-плотных везикул моторных терминалей [6]. Ранее мы показали, что для выброса КГРП в нервно-мышечных синапсах требуется активация пресинаптических рианодиновых рецепторов (РиР), сопряженная с выбросом депонированного  $Ca^{2+}$  и активностью СаМКП [4]. Может ли и каким образом активация пресинаптических СВ1-рецепторов влиять на активность РиР и СаМКП, необходимых для выброса КГРП из терминалей, оставалось не ясным. Согласно традиционным представлениям, метаботропные СВ1-рецепторы сопряжены с Gi-белками, и их активация приводит к торможению аденилатциклазы и  $Ca^{2+}$ -каналов терминалей [1]. Однако описаны и неканонические случаи сопряжения СВ1-рецепторов с Gq-белками и возможностью активации фосфолипазы С

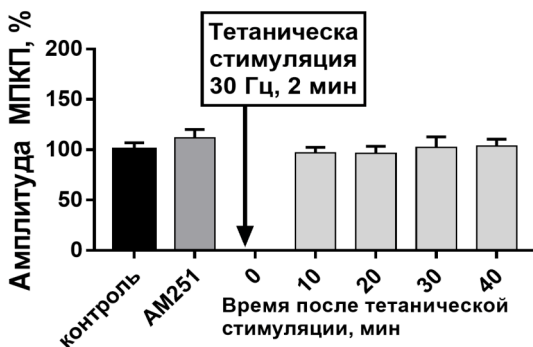
для последующего выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках [7]. В связи с этим, в дальнейших сериях мы анализировали, как изменятся эффекты 2-АГ в отношении прироста амплитуды МПКП на фоне предварительной блокады а) активности фосфолипазы С с помощью U-73122 (5 мкМ); б) активности РнР с помощью рианодина (3 мкМ); в) активности СаМКП с помощью KN93 (3 мкМ). Мы установили, что во всех перечисленных случаях действие 2-АГ не вызывало прироста амплитуды МПКП (рис. 1Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существовании в моторных синапсах функционального сопряжения между активностью СВ1-рецепторов и тандемом РнР/ $\text{Ca}^{2+}$ -депо/СаМКП терминалей, участвующих в выбросе КГРП. Это позволяет выстроить цепь событий, инициируемых действием экзогенного 2-АГ на СВ1-рецепторы нервных терминалей. При сопряжении СВ1-рецепторов с Gq-белками, их срабатывание может приводить к активации фосфолипазы С и запуску с ее участием каскада, приводящего к выбросу кальция из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (за счёт активации РнР), активации СаМКП и  $\text{Ca}^{2+}$ /СаМКП-зависимому выбросу CGRP. В свою очередь, дальнейшее аутокринное действие КГРП на пресинаптические КГРП-рецепторы может запускать каскад (с участием фермента РКА), конечной мишенью которого является усиление накачки АХ в везикулы.

**Роль эндогенного 2-АГ.** Впервые выявленное нами не прямое, опосредованное нейропептидом КГРП потенцирующее действие экзогенного 2-АГ на амплитуду МПКП порождало вопрос о возможности аналогичной активности у эндогенного 2-АГ в моторных синапсах. Примечателен обнаруженный нами ранее факт, что выброс нейрогенного КГРП и его эффекты в моторных синапсах прямо зависят от сократительной активности мышцы [4]. Эта активность может являться источником ретроградных факторов, регулирующих секрецию, в числе которых могут быть и эндоканнабиноиды [8-10]. Доказана возможность синтеза и паракринного действия эндоканнабиноидов в скелетной мускулатуре [9-11].

Для проверки предположения о возможном высвобождении миогенного 2-АГ и его пресинаптического действия, запускающего выброс эндогенного КГРП, мы использовали тетаническую стимуляцию (30 Гц, 2 мин) изолированного нервно-мышечного препарата *n. peroneus-m. EDL*. Ранее на этой модели нами было показано, что имеет место выброс КГРП, приводящий к выраженному приросту амплитуды МПКП через 20 минут после тетануса [12]. Аналогичную схему эксперимента использовали и в данной работе, предварительно блокируя СВ1-рецепторы при помощи АМ 251 (1 мкМ). Мы установили, что добавление АМ 251 в омывающий раствор перед тетанической стимуляцией нерва и мышцы полностью предотвращает прирост

амплитуды МПКП на протяжении от 0 до 40 минут после стимуляции (рис. 2). Эти данные позволяют предполагать, что наблюдаемый в посттетанический период прирост амплитуды МПКП требует предварительной активации СВ1-рецепторов с участием эндогенного 2-АГ, который, действуя ретроградно, необходим для выброса эндогенного КГРП из терминалей и проявления его эффектов в моторных синапсах.



**Рис. 2.** Среднее значение амплитуды МПКП (нормализованы к контролю, принятый за 100%) на фоне предварительного действия AM 251 (1 мкМ) и при его дальнейшем действии в интервалах 10, 20, 30 и 40 минут после тетанической стимуляции малоберцового нерва (2 мин, 30 Гц)

**Заключение.** Проведенные исследования впервые показали, что как экзогенно апплицируемый 2-АГ, так и эндогенный 2-АГ, образующийся при мышечном сокращении, могут, ретроградно действуя на пресинаптические СВ1-рецепторы, запускать каскад, приводящий к выбросу нейрогенного КГРП терминалей и далее к КГРП-опосредованному увеличению амплитуды МПКП. Данный каскад включает в себя активацию фосфолипазы С, зависимой от неё выброс депонированного кальция и активацию СаМКП, результатом чего является высвобождение КГРП из нервных терминалей как модулятора размеров квантов АХ и амплитуды МПКП. Выявленные механизмы неканонического непрямого потенцирующего действия 2-АГ на размер кванта АХ в моторных синапсах мышцы не имеет аналогов в современной литературе, посвященной эффектам эндоканнабиноидов. Полученные данные расширяют современные представления о диапазоне возможной активности эндоканнабиноидов и открывают перспективы для дальнейших исследований.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00065.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Battista N., Di Tommaso M., Bari M., Maccarrone M. // *Front. Behav. Neurosci.* 2012. 6: 9-32.
2. Tarasova, E., Khotkina N, Gaydukov A., Balezina O. // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021. 76(1): 1-6.
3. Gaydukov A., Balezina O. // *Brain Behav.* 2018. 8(8): 1058.
4. Bogacheva, P., Golikova E, Balezina O. // *Biochem. (Moscow), Suppl. A: Membr. Cell Biol.* 2018. 12(3): 268-77.
5. Christiansen I., Edvinsson J., Reducha P. et al. // *J. Headache Pain* 2022. 23(1): 30.
6. Dessem D., Ambalavanar R., Evancho M. et al. // *Pain.* 2010. 149(2): 284-95
7. Diez-Alarcia R., Ibarra-Lecue I., Lopez-Cardona A. et al. // *Front. Pharmacol.* 2016. 7: 415-25.
8. Hillard C. // *Neuropsychopharmacology.* 2018. 43(1): 155-72.
9. Dalle S., Schouten M., Gitte Meeus G. et al. // *J. Cell Physiol.* 2022. 237(9): 3517-40.
10. Le Bacquer O., Salles J., Piscitelli F. et al. // *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022. 13(1): 662-76.
11. Isaac A., Lima-Filho R., Lourenco M. et al. // *Neuropharmacology.* 2021. 197: 108744-58.
12. Bogacheva P., Balezina O. // *Synapse.* 74(12). e22175.

\*\*\*

# СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

## ОСОБЕННОСТИ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА И УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТОВ ПЕЧЕНИ МЫШИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ РЕЖИМА КОРМЛЕНИЯ

*Дмитриева С.А.<sup>1</sup>, Краснова А.Н.<sup>2</sup>, Вологин Д.С.<sup>3</sup>, Пономарева А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,  
Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup>Казанская государственная академия ветеринарной медицины  
имени Н.Э. Баумана, Казань, Россия

**Введение.** Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) на сегодняшний день является одним из самых распространенных заболеваний печени на планете, при котором в гепатоцитах накапливаются липидные капли (ЛК), содержащие преимущественно триглицериды (ТГ) и эфиры стерола [1]. Первостепенное значение в развитии данной патологии имеет неправильное питание, в котором преобладают жиры и углеводы. Ключевую роль в патофизиологии НАЖБП играют нарушения редокс-метаболизма и митохондриальная дисфункция, которые на ультраструктурном уровне выражаются в нарушении структуры митохондрий, стрессе эндоплазматического ретикулума (ЭР) и в изменении ультратонких взаимодействий между ними [2]. В связи с этим особую важность при моделировании НАЖБП у лабораторных животных имеет исходное состояние клеток печени (отсутствие жирового гепатоза и других патологических изменений) в частности для оценки изменений биохимического статуса органа и морфо-функциональных характеристик органелл в гепатоцитах. Кроме того было показано, что при кормлении лабораторных животных (мышей и крыс) сухими кормами в клетках печени могут развиваться значительные деструктивные изменения без дополнительных внешних воздействий [3]. Наличие контрольного варианта, который по биохимическим и морфологическим параметрам будет отражать нормальное состояние печени, по-прежнему остается актуальной проблемой, чтобы моделирование НАЖБП и других печеночных патологий не носило многофакторного характера и не зависело от исходного состояния органа в животной модели. В настоящем исследовании мы проанализировали накопление ЛК, изменение редокс-метаболизма и состояния органелл в тканях печени мыши при разных режимах кормления животных.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на трехмесячных самцах белых лабораторных мышей линии balb-c, которых содержали в клетках  $22 \times 30 \times 16$  см при постоянной температуре 22-24°C, в режиме освещения день/ночь (12/12) при неограниченном доступе к чистой питьевой воде. В настоящем исследовании анализировали состояние печени и крови двух групп животных получавших полнорационный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» для лабораторных животных (содержание мышей, крыс, хомяков) ПК 120-2\_46. Первая группа имела неограниченный доступ к еде, вторая группа – три недели была ограничена в питании в течение 8 часов в сутки (с 8.00 до 16.00 ч). Забор и фиксацию тканей и крови всех групп животных проводили после 8 часового голодания. Накопление ЛК анализировали на фиксированных в формальдегиде препаратах после окраски LipidTOX с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), при  $\lambda_{ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 560$  нм. Анализ ультраструктуры клеток печени проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7800 (Hitachi High-Tech Corporation, Токуо, Япония). Фиксацию тканей проводили по стандартной методике, как описано ранее [4]. Для биохимических исследований использовали кровь и ткани, которые были мгновенно заморожены в жидком азоте и хранились в морозильной камере при  $-80^\circ\text{C}$  до начала эксперимента. Содержание аспаратаминотрансфераз (АСТ) и аланинаминотрансфераз (АЛТ) анализировали в сыворотке крови с помощью коммерческих наборов. Уровень окислительной модификации белков (ОМБ), перекисного окисления липидов (ПОЛ), содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$ , активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГП) определяли в растворимой фракции гомогената тканей печени с помощью методов, описанных ранее [5]. Работа была проведена в соответствии с директивой ЕС 2010/63/ЕС и этическим комитетом КИББ КазНЦ РАН. Все эксперименты проводили в 3-4 биологических и 2 аналитических повторностях. Данные представлены как среднее арифметическое значение со стандартным отклонением. Статистическая обработка результатов производилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

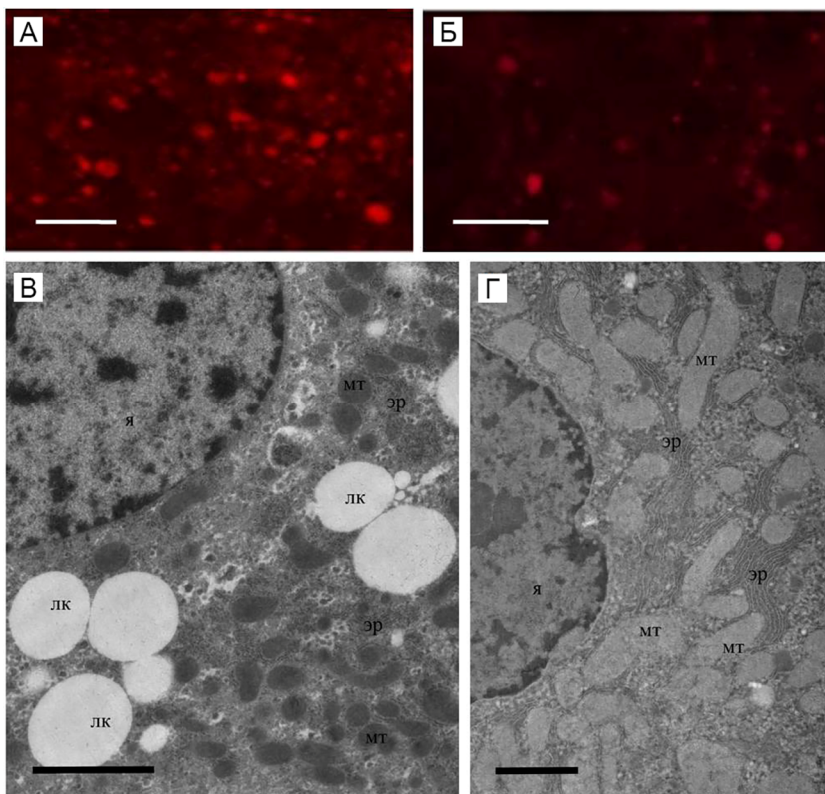
**Результаты.** В наших исследованиях показано, что при изменении режима кормления редокс-метаболизм в тканях печени существенно не менялся. Единственным достоверно значимым являлось небольшое снижение содержания окисленных белков во второй экспериментальной группе (табл. 1). Содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$ , уровень ПОЛ и активность проанализированных нами ферментов антиоксидантной защиты в течение трех недель эксперимента оставались примерно на том же уровне, что и в тканях исходной группы. Небольшое снижение активности СОД и ГП происходило во второй экспериментальной группе, однако эти изменения были статистически не достоверны ( $p > 0.05$ ).

**Табл. 1.** Биохимические показатели крови и тканей печени мыши при изменении режима питания.

Экспериментальная группа	Исходная группа	1 группа	2 группа
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль/г ткани	5.6 ± 1.8	6.8 ± 1.6	6.1 ± 1.8
ПОЛ, мкг/г ткани	4.1 ± 0.7	4.5 ± 0.8	4.0 ± 0.9
ОМБ, нг/мг белка	0.85 ± 0.08	0.88 ± 0.11	0.67 ± 0.13*
АЛТ, ед/л	52.7 ± 2.8	51.1 ± 3.6	50.5 ± 1.8
АСТ, ед/л	120.4 ± 17.7	124.4 ± 11.0	123.8 ± 9.1
СОД, усл.ед./мин/мг белка	57.7 ± 4.1	56.1 ± 6.5	50.5 ± 5.7
КАТ, усл.ед./мин/мг белка	20.4 ± 1.1	18.9 ± 1.9	22.0 ± 2.4
ГП, усл.ед./мин/мг белка	46.9 ± 3.1	47.5 ± 1.6	45.8 ± 3.5
ГР, усл.ед./мин/мг белка	14.2 ± 2.0	14.4 ± 2.4	11.3 ± 3.2

\* – достоверные отличия при  $p < 0.05$ .

Содержание мышей при неограниченном доступе к еде приводило к избыточному накоплению ЛК в гепатоцитах, которые были визуализированы с помощью конфокальной микроскопии (рис. 1А). При этом мы не обнаружили достоверного изменения в содержании АСТ и АЛТ (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии повреждения печени и внутрипеченочного воспаления при разных режимах кормления животных. При анализе гепатоцитов печени с помощью электронной микроскопии было выявлено, что, помимо увеличения количества ЛК, которые имели многочисленные сайты контактов с митохондриями (рис. 1В), ультраструктура гепатоцитов значительно отличалась от классического типа, описанного в научной литературе [6]. У первой группы животных митохондрии имели конденсированный вид, в цитоплазме клеток наблюдали излишнее скопление гликогена, расширение канальцев ЭР (рис. 1В). При этом общая структура ткани была не нарушена, хорошо просматривались границы соседних гепатоцитов, эндотелиальные клетки капилляров, желчные каналцы. При изменении режима питания через три недели в гепатоцитах происходило значительное снижение количества ЛК и гранул гликогена, митохондрии приобретали ортодоксальный вид, и образовывали многочисленные контакты с протяженными канальцами ЭР (рис. 1Б, Г). Таким образом, при изменении режима питания ультраструктура гепатоцитов приобретала более «классический» вид, описанный в научной литературе, что свидетельствует о нормализации функциональной активности митохондрий и восстановлении липидного метаболизма.



**Рис. 1.** Накопление ЛК (А, Б) и ультраструктура гепатоцитов (В, Г) печени мышей, содержащихся в первые три месяца жизни при неограниченном доступе к пище и далее в течение 3 недель имеющих: А, В – постоянный доступ к еде; Б, Г – имеющих в течение суток 16-часовой доступ к еде. ЛК окрашены в красный цвет. Сокращения: лк – липидные капли, мт-митохондрия, эр– эндоплазматический ретикулум, я – ядро. Масштабный отрезок: А, Б – 20 мкм; В, Г – 2 мкм.

**Обсуждение.** В наших экспериментах мы установили, что при неограниченном доступе к пище в тканях печени у мышей может содержаться большое количество ЛК. Накопление ЛК является одним из начальных симптомов НАЖБП, которая обычно протекает в организме человека и животных бессимптомно, но часто носит прогрессирующий характер, приводя к развитию фиброза, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы, а также повышает риск развития различных метаболических симптомов, таких как ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет второго типа и других [1]. Изменение режима питания является одним из механизмов, который ведет к восстановлению печеночного метаболизма [7]. Мы полагаем, что выявленное нами снижение излишнего



количества ЛК и нормализация морфо-функционального состояния митохондрий при изменении режима питания позволяет использовать данный экспериментальный вариант для моделирования начальных стадий НАЖБП и выявлению роли в патогенезе этого заболевания митохондрий. Во-первых, данный вариант позволит нивелировать негативное влияние содержащихся в стандартных кормах неконтролируемых, не подлежащих мониторингу компонентов [3], приводящих к излишнему накоплению ЛК и другим деструктивным изменениям в гепатоцитах. Помимо этого данный режим кормления соответствует нормальному суточному режиму питания мышей в природе, а также позволит проводить ежедневный забор биологического материала натошак не вызывая дополнительного стресса у животного.

Интересно, что, несмотря на различное состояние основных АФК-продуцирующих органелл – митохондрий, в клетках первой и второй групп, редокс-статус этих тканей достоверно не различался, что свидетельствует об адекватной работе систем антиоксидантной защиты, которые способствуют поддержанию стабильного редокс-метаболизма печени. Небольшое снижение окисленных белков в тканях второй группы, может свидетельствовать о меньшем повреждении и более низкой генерации АФК при ортодоксальном состоянии митохондрий, а также об активации в печени аутофагии и более эффективному удалению продуктов ОМБ из метаболизма клетки. Процесс аутофагии, который при нормальном функционировании печени, богатой лизосомами, имеет высокий конститутивный уровень, является основным механизмом, контролирующим метаболизм печени, не только как способ избавления от окислительного стресса, связанного с повреждающими воздействиями, но и как физиологический ответ на циклы голодания и кормления [7]. Роль аутофагии при НАЖБП является сложной и многофакторной в различных типах клеток печени и на разных стадиях заболевания [8]. Будущие исследования позволят понять, является ли нарушение процессов селективной (мито-, ретикуло-, липофагии) или неселективной аутофагии наиболее важным механизмом в поддержании липидного гомеостаза печени и в прогрессировании НАЖБП.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что при изменении режима кормления происходят существенные морфо-функциональные перестройки митохондрий и ЭР, однако в тканях сохраняется стабильный редокс-метаболизм. Это свидетельствует о необходимости контролировать не только исходные биохимические параметры ткани, но и исходное состояние органелл, от которых во многом зависит поддержание энергетического метаболизма в норме, запуск сигнальных каскадов при стрессовом ответе и уровень деструктивных изменений в клетках при патологии.

Работа выполнена в рамках госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Scorletti E., Carr R.M.* // J. Hepatol. 2022. 76(4): 934-45.
2. *Flessa C.M., Kyrou I., Nasiri-Ansari N. et al.* // J. Cell Biochem. 2022. 123(10): 1585-606.
3. *Вайс В.Б., Вангели И.М., Аверина О.А. et al.* // Биохимия. 2020. 85(9): 1294-304.
4. *Khismatullin R.R., Ponomareva A.A., Nagaswami C. et al.* // J. Thromb. Haemost. 2021. 19(12): 3062-72.
5. *Яковлев А.В., Дмитриева С.А., Краснова А.Н. и др.* // Нейрохимия. 2022. 3(3): 243-50.
6. *Bruni C., Porter K.R.* // Am. J. Pathol. 1965. 46: 691-755.
7. *Chung K.W., Chung H.Y.* // Nutrients. 2019. 11(12): 2923.
8. *An L., Wirth U., Koch D. et al.* // Metabolites. 2023. 13(1): 101.

### КОНЦЕНТРАЦИОННО-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА СМЕРТИ DR5 РЕЦЕПТОР-СЕЛЕКТИВНЫМ ВАРИАНТОМ ЦИТОКИНА TRAIL DR5-B В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ

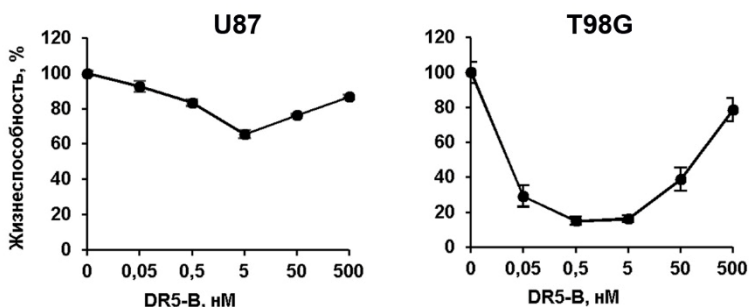
*Исакова А.А.<sup>1,2</sup>, Антипова Н.В.<sup>1</sup>, Мазур Д.В.<sup>1</sup>,  
Гаспарян М.Э.<sup>1</sup>, Яголович А.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

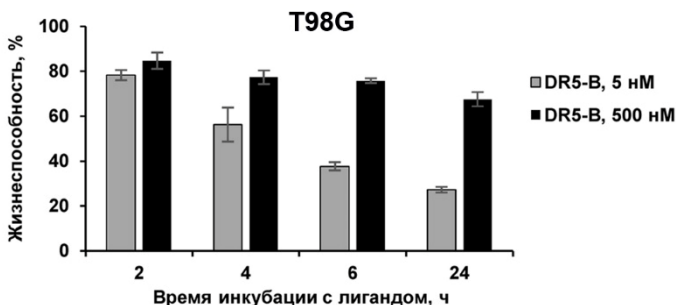
<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) является природным цитокином из семейства TNF (Tumor necrosis factor), который селективно индуцирует гибель опухолевых клеток путем апоптоза при активации рецепторов смерти DR4 либо DR5. В связи с этим механизм гибели опухолевых клеток путем активации рецепторов смерти TRAIL является перспективным для разработки новых направлений противоопухолевой терапии. В течение последних 15 лет разрабатываются и испытываются в доклинических и клинических исследованиях различные агонисты рецепторов смерти TRAIL, включая рекомбинантные варианты TRAIL и антитела, нацеленные на рецепторы DR4 и DR5. Известно, что рецептор DR5 является ключевым при активации механизма TRAIL-индуцированной гибели опухолевых клеток [1]. Ранее мы разработали рецептор-специфичный вариант цитокина TRAIL DR5-B, который селективно связывается с рецептором смерти DR5 и более эффективно вызывает гибель опухолевых клеток по сравнению с TRAIL дикого типа. DR5-B является перспективной платформой для разработки новых противоопухолевых препаратов [2-4]. Кроме того, благодаря высокой специфичности к рецептору DR5, лиганд DR5-B является

удобным инструментом для исследования DR5-опосредованной сигнализации. В данной работе исследована концентрационно-зависимая цитотоксическая активность рецептор-селективного лиганда DR5-B на линиях клеток глиобластомы человека *in vitro*.



**Рис. 1.** Цитотоксическая активность лиганда DR5-B на клеточных линиях глиобластомы человека U87 и T98G, культивируемых в 96-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста спустя 24 часа инкубации.

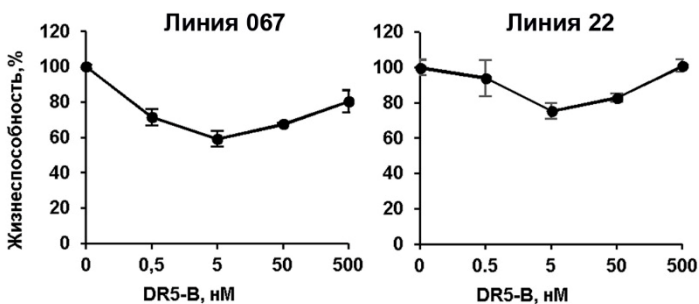


**Рис. 2.** Цитотоксическая активность лиганда DR5-B на клеточной линии глиобластомы человека T98G спустя 2, 4, 6 и 24 часа инкубации. Жизнеспособность клеток была определена с помощью МТТ-теста.

**Результаты.** Цитотоксическая активность лиганда DR5-B на клеточных линиях глиобластомы человека U87 и T98G была исследована с помощью МТТ-теста. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассаживали на 96-луночные планшеты (1×10<sup>5</sup> клеток на лунку) и инкубировали с препаратом DR5-B в течение 24 ч. Было показано, что DR5-B в низких концентрациях (0.05-0.5 нМ в зависимости от клеточной

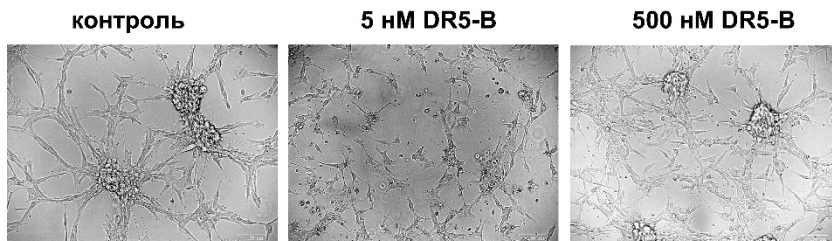
линии) эффективно убивает клетки глиобластомы. Максимальная гибель клеток линий U87 и T98G наблюдалась при концентрации DR5-B 5 нМ и составила 40% и более 80%, соответственно (рис. 1). При этом на обеих линиях наблюдалось драматическое снижение цитотоксической активности лиганда DR5-B при повышении концентрации до 500 нМ. Важно отметить, что эффект дозозависимой устойчивости клеток к лиганду проявлялся уже в первые 2-4 часа инкубации, как показано на клеточной линии T98G (рис. 2).

Аналогичный эффект наблюдался для первичных линий глиобластомы 22 и 067, отобранных с биопсийных образцов пациентов НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко (рис. 3). Важно отметить, что на всех исследованных линиях глиобластомы человека концентрация лиганда DR5-B, вызывающая максимальную клеточную гибель, была одинакова и составила 5 нМ. Ранее подобный дозозависимый эффект был показан на клеточных линиях другого происхождения. Причем на опухолевой клеточной линии колоректального рака HCT116 и Т-лимфобластной лейкемии Jurkat максимальная цитотоксичность также наблюдалась при концентрации лиганда DR5-B 5 нМ [5].



**Рис. 3.** Цитотоксическая активность лиганда DR5-B на первичных линиях глиобластомы человека 22 и 067, культивируемых в 96-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста спустя 120 часов инкубации.

Данные, полученные с помощью МТТ-теста на 96-луночных планшетах, подтверждались морфологическими изменениями клеток при воздействии лиганда DR5-B в различных концентрациях. К примеру, при инкубации клеток линии U87 с 5 нМ DR5-B в течение 24 ч не наблюдалось образования сфероидных 3D-структур, в отличие от контрольных клеток. При этом воздействие 500 нМ DR5-B практически не влияло на морфологию клеток линии U87 (рис. 4).



**Рис. 4.** Морфология клеток глиобластомы человека U87 при воздействии лиганда DR5-B в различных концентрациях в течение 24 часов.

**Заключение.** В данной работе исследована дозозависимая резистентность линейных и первичных клеточных культур глиобластомы человека к рецептор-селективному варианту цитокина TRAIL DR5-B, специфично связывающемуся с рецептором смерти DR5. Показано, что устойчивость клеток к DR5-опосредованной гибели зависит от концентрации лиганда. Оптимальная концентрация лиганда DR5-B, индуцирующая максимальную клеточную гибель, составляет 5 нМ как для линейных, так и для первичных культур глиобластомы независимо от степени чувствительности конкретной линии к лиганду. Однако, как линейные, так и первичные культуры опухолевых клеток демонстрируют устойчивость к высоким концентрациям лиганда. Очевидно, дозозависимый эффект является универсальным, не зависит от конкретной клеточной линии и происхождения опухоли. При этом амплитуда эффекта дозозависимой резистентности, вероятно, связана с альтернативными механизмами резистентности клеток к DR5-B-индуцированному апоптозу и коррелирует с гетерогенностью популяции конкретной линии клеток. Таким образом, было показано, что сигнальные пути рецептора смерти DR5 и к DR5-опосредованной гибели меняются в зависимости от концентрации лиганда. Причем чувствительность клеток глиобластомы к DR5-опосредованной клеточной гибели снижается при высоких концентрациях лиганда.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00224, <https://rscf.ru/project/21-14-00224/>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Malin D., Chen F., Schiller C. et al. // Clin. Cancer Res. 2011. 17: 5005-15.
2. Gasparian M.E., Chernyak B.V., Dolgikh D.A. et al. // Apoptosis. 2009. 14: 778-87.
3. Yagolovich A.V., Artykov A.A., Isakova A.A. et al. // IJMS. 2022. 23: 5860.
4. Yagolovich A.V. et al. // IJMS. 2022. 23: 12687.
5. Yagolovich A.V., Artykov A.A., Karmakova T.A. et al. // Trans. Oncol. 2020. 13. 100762.

# МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФРАГМЕНТОВ S- И M- БЕЛКОВ SARS-COV-2 У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ И БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

*Кулиш А.Д., Дюкина А.Р., Тихонова И.В.*

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение  
Федерального государственного учреждения науки «Федеральный  
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических  
исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

**Введение.** COVID-19 характеризуется острым респираторным и гиперкоагуляционным синдромами и приводит к тяжелым осложнениям и летальным исходам [1]. Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) является наиболее распространенным сопутствующим заболеванием, в значительной степени отягощающим течение COVID-19 [2]. COVID-19, сам по себе, может привести к развитию гипергликемии и СД2Т, что увеличивает риск смерти. Как СД2Т, так и COVID-19 характеризуются нарушениями регуляции иммунного и воспалительного ответов, приводящими к легочной и полиорганной недостаточности у больных COVID-19 [3]. Контроль гликемии у больных COVID-19 с СД2Т уменьшает тяжесть заболевания, но большинство противодиабетических препаратов повышают уровень ангиотензинпревращающего фермента 2, опосредующего вход SARS-CoV-2 в клетку, в различных органах, что усиливает инфицирование, приводящее, в конечном итоге, к острому респираторному дистресс-синдрому [4]. Поэтому необходим поиск новых терапевтических мишеней в отношении COVID-19 у больных СД2Т. Мы полагаем, что такими мишенями выступают нейтрофилы, поскольку именно эти клетки врожденного иммунитета являются ключевыми игроками возникновения и развития комплекса осложнений при СД2Т, как и острого респираторного дистресс синдрома при COVID-19 [5]. В настоящее время мало данных о модификации защитных функций нейтрофилов фрагментами SARS-CoV-2, а данные о сигнальных путях, участвующих в активации и развитии патологического воспаления с участием нейтрофильных гранулоцитов при COVID-19 у лиц с СД2Т, практически отсутствуют. Целью работы было исследование влияния фрагментов S- и M-белков SARS-CoV-2 на адгезивные свойства нейтрофилов и их генерацию активных форм кислорода (АФК) у условно здоровых добровольцев и пациентов с СД2Т.

**Методы.** Объектом исследования являлись изолированные полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы), полученные из периферической крови условно здоровых доноров и

больных СД2Т с помощью центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколл – урографин с последующими отмывками. Образцы клеток ( $10^7$ /мл) сохранялись при 4°C и использовались для измерений через 1 ч после изоляции. Зрелые нейтрофилы в полученной суспензии клеток определялись по форме ядра при окрашивании флуоресцентным красителем акридиновый оранжевый с помощью флуоресцентной микроскопии. Жизнеспособность клеток, определяемая окрашиванием трипановым синим, составляла ~98%.

Оценивали влияние пептидных фрагментов S- и M-белков SARS-COV-2 на адгезивные свойства нейтрофилами и генерацию АФК. Пептидные фрагменты были выбраны коллегами из Института проблем передачи информации РАН и VirIntel Inc на основании предсказаний наиболее эффективных эпитопов с помощью программы BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>).

Адгезия гранулоцитов, полученных от условно здоровых доноров и больных СД2Т, оценивалась по стандартному протоколу [6]. Пробы клеток инкубировали 40 мин в 96-луночных планшетах в присутствии фрагментов S- и M-белков (S357:380, S592:647, S673:713 и его мутантная форма S673:713 p681H, M105:117) в концентрационном диапазоне 10-1000 нг/мл, хемотаксических факторов: 0.1 мкМ N-formyl-MLF (fMLF, активация FPR1), 1 мкМ WKYMVM (синтетический агонист FPR2), 1 мкМ форболовый эфир (PMA, прямой активатор PKC), а также при одновременном присутствии фрагментов S- или M-белков и хемотаксических факторов. После инкубации и фиксации прикрепившихся клеток они окрашивались по методу Романовского-Гимзы, затем лизировались, после чего измерялась оптическая плотность (ОП), являющаяся отражением количества прикрепившихся клеток, с помощью фотометра Infinity F50 (Tecan, Austria) при длине волны 620 нм. Изменение ОП при действии исследуемых фрагментов S- и M-белков и активатор определялось при сравнении с ОП, полученной от интактных клеток.

Интенсивность генерации АФК регистрировалась по люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) в изолированных гранулоцитах с помощью 12-ячеечного хемилюминометра ХЕМИЛЮМ-12 (ИБК РАН). Для активации дыхательного взрыва использовался опсонизированный зимозан (ОЗ, 62.5 и 250 мг/л), fMLF (0.1 мкМ), WKYMVM (1 мкМ) и PMA (1 мкМ). Исследовали как прямое влияние пептидных фрагментов на интенсивность генерации АФК (спонтанную хемилюминесценцию), так и их модифицирующее действие на ответы клеток, вызванных ОЗ, fMLF, WKYMVM и PMA. Анализировали следующие параметры: базовый уровень АФК (спонтанный уровень ХЛ), лаг-период, скорость развития ответа (наклон), амплитуда ответа (максимальная интенсивность ХЛ в ответ на стимул), продукция АФК.

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании влияния пептидных фрагментов S- и M-белков на адгезивные свойства нейтрофилов у здоровых доноров и больных СД2Т были получены следующие результаты. Фрагмент S357:380 усиливал адгезию нейтрофилов как у здоровых доноров, так и у больных СД2Т относительно соответствующих интактных клеток. fMLF и WKYMVM также усиливали адгезию нейтрофилов по сравнению с интактными клетками в обеих группах испытуемых, в то время как PMA не изменял адгезивные свойства нейтрофилов в исследуемых группах. Совместная инкубация S357:380 с хемотаксическими факторами также увеличивала адгезию нейтрофилов относительно интактных клеток, однако не влияла значительно на эффекты отдельных веществ. Фрагмент S592:647 увеличивал адгезию нейтрофилов как сам по себе, так и в присутствии fMLF, WKYMVM или PMA (при высоких концентрациях S592:647) в группе условно здоровых добровольцев относительно соответствующих интактных клеток. У больных СД2Т S592:647 сам по себе не влиял на адгезию нейтрофилов по сравнению с интактными клетками. Однако было выявлено увеличение адгезии под действием fMLF и WKYMVM относительно интактных клеток у больных. Совместная инкубация fMLF или WKYMVM с S592:647 увеличивала адгезию нейтрофилов относительно эффекта S592:647, однако данные изменения не носили достоверного характера. PMA не влиял на адгезию нейтрофилов как сам по себе относительно соответствующих интактных клеток, так и в присутствии S592:647 как у здоровых доноров, так и у больных СД2Т. Фрагмент S673:713 вызывал значительное усиление адгезии нейтрофилов как сам по себе, так и в присутствии агонистов рецепторов к формилированным пептидам (FPRs) у здоровых доноров и у больных СД2Т относительно соответствующих интактных клеток. Кроме того, совместная инкубация S673:713 с PMA также значительно увеличивала адгезию нейтрофилов в обеих группах испытуемых по сравнению с интактными клетками. Мутантная форма S673:713 p681H, fMLF, WKYMVM и PMA усиливали адгезию нейтрофилов у здоровых доноров и не изменяли ее у больных СД2Т относительно соответствующих интактных клеток. Совместная инкубация S673:713 p681H с хемотаксическими факторами также увеличивала данный параметр по сравнению с интактными клетками у здоровых доноров и при некоторых концентрациях S673:713 p681H – у больных. Фрагмент M105:117 также усиливал адгезию нейтрофилов как сам по себе, так и в присутствии fMLF, WKYMVM и PMA у здоровых испытуемых (за исключением M105:117 и fMLF), так и у больных СД2Т относительно интактных клеток, однако эти эффекты были слабее по сравнению с эффектами пептидных фрагментов S-белка SARS-CoV-2.

При исследовании влияния пептидных фрагментов S- и M-белков SARS-CoV-2 на генерацию АФК нейтрофилами как основной цитотоксической функции в норме и при СД2Т мы получили следующие



результаты. Базовый уровень ХЛ не отличался между исследуемыми группами, что может свидетельствовать о покое состоянии нейтрофилов у больных СД2Т. Используемые фрагменты S- и M-белков не влияли на спонтанную ХЛ в обеих группах испытуемых. Кроме того, Фрагмент S357:380 не модифицировал фагоцитоз-зависимую (в ответ на ОЗ) и PMA-вызванную продукцию АФК у условно здоровых испытуемых. Высокие концентрации этого пептидного фрагмента вызывали достоверное увеличение продукции АФК в ответ на агонисты FPRs (fMLF и WKYMVM) у здоровых доноров относительно интактных клеток. У больных СД2Т высокие концентрации данного фрагмента увеличивали продукцию АФК в ответ на WKYMVM и PMA относительно интактных клеток, и не влияли на ОЗ- и fMLF-вызванный ответ. Фрагмент S592:647 не влиял на продукцию АФК в ответ на fMLF и PMA, и немного подавлял WKYMVM-вызванную реакцию нейтрофилов у здоровых доноров относительно интактных клеток. У больных было выявлено увеличение продукции АФК в ответ на PMA при высокой концентрации этого фрагмента относительно интактных клеток и отсутствие изменений в ответ на другие стимулы. Высокие концентрации пептидного фрагмента S673:713 значительно увеличивали продукцию АФК в ответ на все стимулы у здоровых доноров относительно интактных клеток. У больных высокая концентрация S673:713 усиливала продукцию АФК только в ответ на PMA. Мутантная форма S673:713 p681H также увеличивала данный параметр в ответ на ОЗ в обеих исследуемых группах. Пептидный фрагмент M105:117 не влиял на продукцию АФК в ответ на используемые стимулы у здоровых испытуемых, в то время как у больных он повышал продукцию АФК в ответ на агонисты FPRs.

**Заключение.** Таким образом, используемые в работе фрагменты S- и M-белков SARS-CoV-2 значительно усиливали адгезию нейтрофилов у здоровых доноров как отдельно, так и в присутствии хемотаксических факторов. При этом наибольшее влияние оказывали фрагменты S673:713 и его мутантная форма. Однако у больных СД2Т наблюдалось отсутствие изменений данного параметра в присутствии некоторых пептидных фрагментов S-белка и менее выраженные эффекты при совместном действии пептидных фрагментов с хемотаксическими факторами относительно здоровых испытуемых. Это может свидетельствовать: 1) об усилении адгезионных свойств нейтрофилов у здоровых испытуемых в ответ на действие пептидных фрагментов S- и M-белков SARS-CoV-2, что может приводить к более повышенному хемотаксису данных клеток в очаг инфицирования и воспаления для борьбы с патогеном; 2) об ослаблении адгезионных свойств клеток при СД2Т, что, в свою очередь, может приводить к ослаблению хемотаксиса, и, как следствие, к снижению защитных свойств клеток врожденного иммунитета у больных СД2Т. В данной работе было также выявлено изменение продукции АФК

нейтрофилами под действием пептидных фрагментов S- и M-белков SARS-CoV-2 у здоровых добровольцев и больных СД2Т через разные сигнальные пути. У здоровых доноров усиление продукции АФК наблюдалось, преимущественно, через FPRs, в то время как у больных – через PKC-зависимый механизм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нейтрофилы могут являться потенциальными терапевтическими мишенями для разработки диагностических, профилактических и терапевтических мер в отношении COVID-19 у лиц с существующей хронической патологией СД2Т.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou F. *et al.* // The Lancet. 2020. 395(10229): 1054-62.
2. Apicella M. *et al.* // The Lancet Diabetes & Endocrinology. 2020. 8(9): 782-92.
3. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L. *et al.* // Nature Reviews Immunology. 2020. 20(6): 363-74.
4. Vaduganathan M. *et al.* // New England Journal of Medicine. 2020. 382(17): 1653-9.
5. Lindsley A.W., Schwartz J.T., Rothenberg, M.E. // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2020. 146(1): 1-7.
6. Tikhonova I.V., Grinevich A.A., Guseva I.E., Safronova V.G. // Free Radical Biol Med. 2020. 159: 76-86.

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ NIF ПРОЛИЛГИДРОКСИЛАЗ *IN VIVO*

*Митрошина Е.В., Гавриш М.С., Корокозова М.В.,  
Стрелкова П.Л., Ведунова М.В.*

Институт биологии и биомедицины Национального исследовательского  
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского,  
Нижний Новгород, Россия

**Введение.** По данным ВОЗ, ишемический инсульт является одной из основных причин смертности во всем мире [1]. Гипоксия - ключевой патогенетический компонент ишемического повреждения. Даже кратковременное гипоксическое воздействие может вызвать функциональные и структурные нарушения органов и тканей [2]. Ключевым механизмом, позволяющим клетке адаптироваться к гипоксии, является транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF). HIF представляет собой димер двух белковых субъединиц, HIF- $\alpha$  и HIF- $\beta$ . При нормальном содержании кислорода в тканях субъединица HIF- $\alpha$  подвергается гидролизу ферментами группы HIF пролилгидроксилаз (PHD). Их активность ингибируется при гипоксии, что ведет к

стабилизации комплекса HIF-1 [3]. Поскольку несколько нижестоящих мишеней HIF способны индуцировать нейрогенез и ангиогенез, PHD как ферменты, регулирующие стабильность комплекса HIF, рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических мишеней. Фармакологическое ингибирование PHD приводит к стабилизации комплекса HIF-1 и может иметь терапевтический эффект при лечении ишемического повреждения. Существуют ряд исследований, демонстрирующих, что предварительное гипоксическое кондиционирование мозга, сердца или почек с коротким периодом ишемии защищает от последующего более длительного ишемического воздействия, и этот защитный эффект частично опосредуется HIF [4]. Однако работ, посвященных исследованию роли фармакологической стабилизации фактора HIF в адаптации нервной системы к гипоксическому повреждению на сегодняшний день опубликовано крайне мало, поэтому исследования в данной области являются весьма актуальными. Ранее нами был выполнен цикл работ, посвященный изучению нейропротекторных эффектов ингибирования PHD на уровне нейронных сетей *in vitro* [5,6]. Целью настоящей работы явилось исследование влияния ингибитора PHD Roxadustat на устойчивость животных к гипоксическому повреждению *in vivo*.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явились 8-12 недельные самцы мышей линии C57Bl/6. Для моделирования гипоксии использовалась гипобарическая барокамера. Моделировали подъем животных на высоту 10 000 м над уровнем моря (в камере поддерживалось давление 220-240 мм рт. ст.). Скорость подъема составляла 183 м/с. Животные находились на смертельной площадке до второго агонального вдоха или до максимального времени пребывания в камере – 10 минут. Ингибитор PHD Roxadustat (MedChemExpress, США) применялся внутривентрикулярно в дозах 5 и 10 мг/кг за 30 минут до моделирования гипоксии. Число животных в группе составило 8.

Через 24 часа после моделирования острой гипобарической гипоксии (ОГБГ) проводилось тестирование ориентировочно-двигательной активности животных в тесте «Открытое поле», а также оценивалась рабочая память животных в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ). Также через 24 часа после гипоксического повреждения с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени был оценен уровень экспрессии мРНК HIF-1, нейротрофических факторов BDNF и GDNF и их рецепторов TrkB и GFRA, киназ IKK $\beta$  и FLT-4, транскрипционного фактора Bcl2, а также коннексина 43 (Cx43).

**Результаты.** Показано, что острая гипобарическая гипоксия приводит к гибели 25% животных. В группе «Roxadustat 10 мг/кг» выживаемость животных составила 100%. «Roxadustat» в дозе 5 мг/кг не влиял на выживаемость животных. Также была оценена устойчивость мышей к гипоксическому воздействию. Животные, продолжительность

жизни которых на высоте составляла от 1 до 3 минут, считались низкоустойчивыми, от 4 до 8 минут – среднеустойчивыми, свыше 8 минут – высокоустойчивыми. В обеих группах с применением ингибитора РНД доля среднеустойчивых животных составила 25%, среднеустойчивых 75%, в то время как в группе «Гипоксия» среднеустойчивых животных было 12.5%, низкоустойчивых 87.5%. Таким образом, стабилизация комплекса HIF-1 с помощью ингибирования HIF-пролилгидроксилазы позволяет повысить устойчивость лабораторных животных к действию гипоксии.

Поведенческое тестирование показало, что ОГБГ вызывает угнетение двигательной активности (табл. 1), что проявляется в достоверном снижении дистанции, пройденной на периферии, а также увеличением времени замирания в тесте «Открытое поле». Применение ингибитора РНД позволило частично нивелировать эти изменения. Оценка формирования условного рефлекса пассивного избегания не выявила изменений в оперативной памяти животных в постгипоксическом периоде.

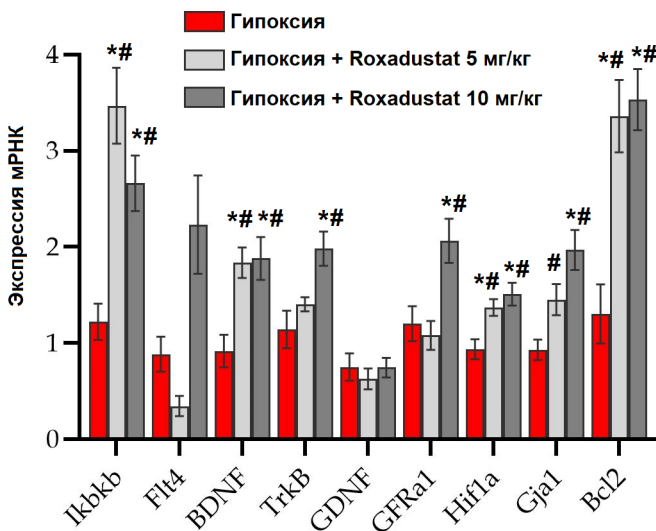
**Табл. 1.** Основные параметры ориентировочно-двигательной активности животных в тесте «Открытое поле» после моделирования ОГБГ.

		Интактные	Гипоксия	Roxadustat 5 мг/кг	Roxadustat 10 мг/кг
Открытое поле	Общая дистанция, см	170.6 ± 18.7	71.1 ± 27.3	111.2 ± 13.4	119.7 ± 25.9
	Дистанция в центре, см	28.6 ± 8.1	32.4 ± 17.6	53.2 ± 2.9	21.4 ± 6.5
	Дистанция на периферии, см	142.0 ± 23.4	38.7 ± 14.6*	57.9 ± 12.5	98.3 ± 24.8
	Время в центре, с	43.9 ± 17.9	137.0 ± 45.3	154.7 ± 19.7	116.3 ± 44.3
	Время на периферии	256.1 ± 17.9	179.7 ± 43.1	145.3 ± 19.7	184.8 ± 44.8
	Время замирания	65.4 ± 5.9	177.9 ± 38.2*	111.7 ± 12.7	83.9 ± 25.5
	Средняя скорость, мм/с	5.67 ± 0.63	2.38 ± 0.91	3.7 ± 0.44	4.01 ± 0.85
Число вертикальных стоек	29 ± 8.4	19.2 ± 9.3	30 ± 8.8	31.6 ± 10.6	

\* – отличия достоверны относительно интактной группы,  $p \leq 0.05$ , ANOVA.

Исследование молекулярных механизмов защитного действия Roxadustat продемонстрировало, что ингибирование HIF-пролилгидроксилазы в постгипоксическом периоде ведет к достоверному повышению экспрессии мРНК фактора HIF-1, нейротрофического фактора BDNF, киназы IKK $\beta$  и антиапоптотического фактора Bcl2 (рис. 1).

Более выраженное защитное действие Roxadustat в дозе 10 мг/кг вероятно связано с тем, что при использовании данной дозы отмечается усиление экспрессии рецепторов TrkB и GFRA и коннексина 43, который является ключевым компонентом межклеточных щелевых контактов.



**Рис. 1.** Экспрессия мРНК через 24 часа после моделирования ОГБГ, нормализованная относительно группы «Интактные». \* – различия достоверны относительно.

**Выводы.** Наши эксперименты демонстрируют выраженный нейропротекторный эффект ингибитора РНД Roxadustat при моделировании острой гипобарической гипоксии. Реализации этого эффекта осуществляется через активацию экспрессии ряда генов, в том числе нейротрофического фактора BDNF и его рецептора TrkB и антигипоксического фактора Bcl2. Дальнейшие исследования будут посвящены изучению возможности применения Roxadustat в постгипоксическом периоде.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 22-15-00178.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Carreau A., Hafny-Rahbi B.E., Matejuk A. et al. // J. Cell. Mol. Med. 2011. 15(6): 1239-53.
2. Feigin V., Norrving B., Sudlow C.L.M., Sacco R.L. // Stroke. 2018. 49(9): 2248-55.
3. Semenza G.L. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1998. 8(5): 588-94.
4. Sheldon R.A., Lee C.L., Jiang X. et al. // Pediat. Res. 2014. 76(1): 46-53.

5. Savyuk M., Krivososov M., Mishchenko T. et al. // Antioxidants. 2020. 9(8): 662.  
6. Savyuk M.O., Krivososov M.I., Ivanchenko M.V. et al. // Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Prikladnaya Nelineynaya Dinamika. 2021. 29(3): 421-7.

## NO-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСПРЕССИИ p53 И АПОПТОЗА В ДОРЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЯХ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПЕРЕРЕЗКИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

*Нвосу Ч.Д., Родькин С.В.*

Факультет «Биоинженерия и ветеринарная медицина», кафедра «Биоинженерия», Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия

**Введение.** Нейротравма ежегодно уносит миллионы человеческих жизней во всем мире. Около 10% нейротравм связаны с повреждением периферических нервов вплоть до их полного разрыва, что часто становится причиной инвалидности [1]. Аксотомия (АТ) является одним из видов механического повреждения нервной ткани и характеризуется перерезкой аксона, что часто приводит к гибели нейронов. Важным условием выживания нейронов при АТ является межклеточное взаимодействие с глиальными клетками (ГК). Сигнальные процессы, лежащие в основе выживания либо гибели нейронов и ГК, при АТ до конца не изучены.

В связи с этим большой интерес представляет оксид азота (NO), который является универсальным мессенджером, выполняющим множество функций в организме в норме и при патологических состояниях. Известно, что NO может участвовать в регенерации нейронов после повреждения аксона. Однако его роль при АТ носит противоречивый характер. Особый интерес представляет NO-зависимая регуляция проапоптотического белка p53, играющего важнейшую роль в гибели нейронов. Рядом исследований было показано, что NO может повышать уровень p53 [2]. Однако NO-зависимые сигнальные механизмы, регулирующие уровень p53 при АТ практически не изучены.

Целью данной работы является изучение роли NO в регуляции экспрессии p53 в нейронах и ГК ганглиев дорзальных корешков (DRG, dorsal root ganglia) спинного мозга крысы, а также оценки роли NO в гибели этих клеток при перерезке седалищного нерва (СН).

**Материалы и методы.** DRG содержат тела сенсорных нейронов. Аксоны нейронов DRG включены в СН. Крыс анестезировали внутримышечной инъекцией смесью ксилазина гидрохлорида и телазола. Перерезка СН и выделение DRG выполнялись в соответствии со стандартным протоколом [3]. Неповрежденные контралатеральные DRG использовались в качестве контроля. Декапитация крыс осуществлялась с

помощью гильотины через 4, 24 часа и 7 дней после односторонней перерезки СН. Использовались следующие NO-модуляторы: селективный ингибитор iNOS гемисульфат S-метилизотиомочевины (SMT, 10 мг/кг) и NO-донор нитропруссид натрия (SNP, 3 мг/кг). SMT и SNP вводили после перерезки СН и далее ежедневно до момента декапитации. Контрольной группе крыс вводили физиологический раствор.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. После фиксации 4% PFA и отмывки образцы DRG, полученных через 4 и 24 часа после АТ, помещались в 20% раствор сахарозы и заливались 4% агарозным гелем. Срезы DRG толщиной 20 мкм, полученные на вибраторе, промывали PBS и инкубировали с 5% BSA и 0.3% тритоном X-100 для блокирования сайтов неспецифического связывания. Затем срезы инкубировали с мышинным антителом против p53 (P5813, Sigma-Aldrich, 1:100) и кроличьим антителом против нейроспецифического ядерного белка NeuN (ABN78, Sigma-Aldrich; 1:1000) в течение ночи при 4°C. После промывания PBS срезы инкубировали со вторичными антителами anti-rabbit IgG (H+L), CF<sup>TM</sup> 488A (SAB4600045, Sigma-Aldrich, 1:500) и anti-mouse IgG1 ( $\gamma$ 1), CF<sup>TM</sup>555 (SAB4600302, Sigma-Aldrich, 1:500). Ядра всех нейронов и ГК визуализировали с помощью Hoechst 33342, который окрашивает хроматин. Срезы изучали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX-51. Анализ проводился на 10-15 изображениях для каждого из 6 животных в каждой группе.

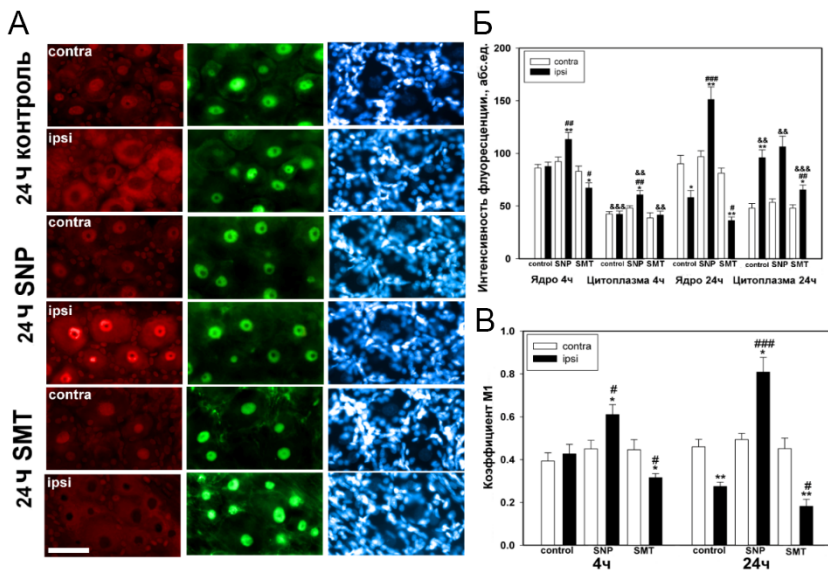
Для вестерн-блота через 4 и 24 часа после АТ объединяли 4 и 5-й DRG 3 крыс. После ультразвуковой гомогенизации на льду в лизирующем буфере Lysis Buffer, дополненном нуклеазой бензоназа и ингибиторами протеаз и фосфатаз, образцы центрифугировали и отбирали супернатант, содержащий цитоплазматические белки. Из осадка экстрагировали ядерные белки буфером Nuclear Extraction Buffer. Лизат центрифугировали и собирали супернатант, содержащий ядерные белки. Образцы подвергали разделению электрофорезом в полиакриламидном геле с последующим электропереносом на поливинил-дифторидную мембрану с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad). После промывания и инкубации в блокирующем буфере TBS мембрану инкубировали с первичным мышинным антителом против p53 (P5813; 1:100) и мышинным антителом анти- $\beta$ -актин (A5441; 1:5000). После промывки в TTBS буфере мембрану инкубировали с вторичными антителами anti-mouse IgG-Peroxidase (A4416-1ML; 1:1000), а затем с Clarity Western ECL. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью системы гель-документации Fusion SL (Vilber Lourmat) с использованием программного обеспечения Vision Capt. Изображения обрабатывались с помощью программного пакета ImageJ.

Для визуализации гибели клеток по пути апоптоза применялся метод TUNEL. Срезы обрабатывались реагентами набора и Hoechst 33342 и помещались во влажную камеру на 1 час при +37°C. Затем препараты

промывались и заключались под предметное стекло. Анализ препаратов осуществлялся на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51WI (Япония), оснащенный цифровой камерой ORCA-Flash4.0 V3, при возбуждении в диапазоне 570-620 нм.

Статистический анализ выполняли с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным *t*-критерием Даннета. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ . Данные были представлены, как Mean  $\pm$  SEM.

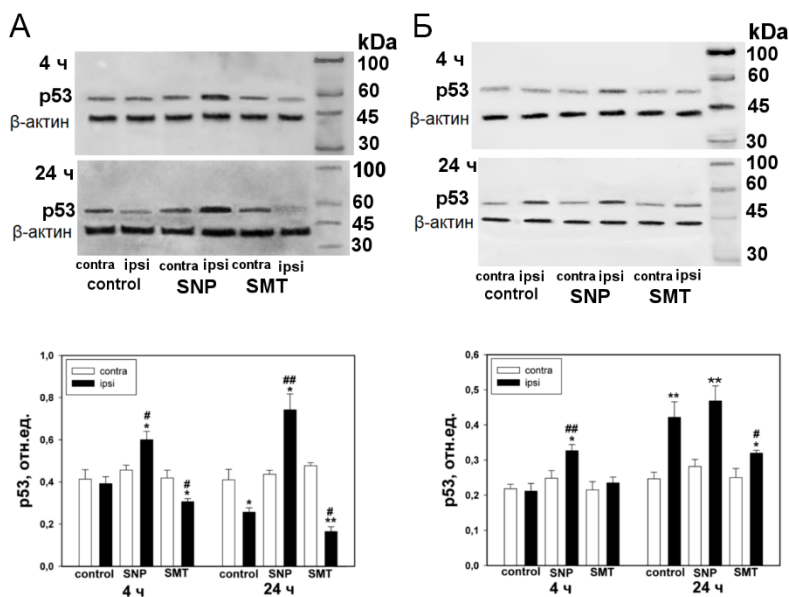
**Результаты и обсуждение.** Наши исследования, показали, что АТ через 24 часа вызывает значительное уменьшение уровня р53 в ядре и практически 2-кратное увеличение его в цитоплазме нейронов (рис. 1А, Б).



**Рис. 1.** Экспрессия р53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контралатерального DRG в контрольной и экспериментальных группах через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (А) – Иммунофлуоресцентная микроскопия: экспрессия р53 через 24 часа после аксотомии. (Б) – Интенсивность флуоресценции. (В) – Коэффициент M1. Достоверность отличий: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  – ипсилатеральный DRG относительно контралатерального DRG одного животного; # –  $p < 0.05$ , ## –  $p < 0.01$ , ### –  $p < 0.001$  – ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG контрольной группы; & –  $p < 0.05$ , && –  $p < 0.01$ , &&& –  $p < 0.001$  – ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG одного животного.  $n = 6$ .



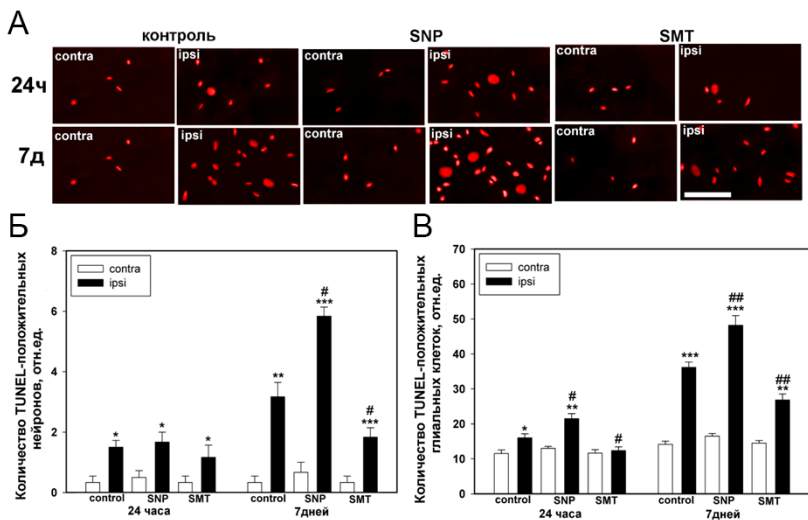
В контралатеральных DRG p53 локализуется, главным образом, в нуклеоплазме нейронов и ГК. О транслокации p53 из ядра в цитоплазму через 24 часа после АТ в нейронах ипсилатерального DRG убедительно свидетельствует уменьшение коэффициента M1, характеризующего колокализацию p53 с NeuN, на 40% относительно контралатерального DRG (рис. 1B). Это указывает, что независимая от транскрипции активность p53 участвует в АТ-индуцированном апоптозе нейронов DRG. Известно, что апоптотическая активность p53 может быть связана с его транслокацией в митохондрии, что вызывает нарушение биоэнергетических процессов, высвобождение Сyt c и AIF, активацию каспазы 3 [4].



**Рис. 2.** Вестерн-блот анализ. Влияние SNP и SMT на экспрессию белка p53 в ипсилатеральном DRG и контралатеральном DRG через разное время после аксотомии. (А) – ядерная фракция. (Б) – цитоплазматическая фракция. Достоверность отличий: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  – ипсилатеральный DRG относительно контралатерального DRG одного животного; # –  $p < 0.05$ , ## –  $p < 0.01$ , ### –  $p < 0.001$  – ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG контрольной группы.  $n = 6$ .

Введение SNP приводило к увеличению уровня p53 максимально в ядре и цитоплазме аксотомированных нейронов и в ядрах ГК через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва, как относительно контралатерального DRG этого животного, так и контрольной группы. Иная динамика наблюдалась в ипсилатеральных DRG группы с SMT. Она

была схожей с динамикой в контрольной группе, в аксотомированных нейронах которой наблюдалось перераспределение p53 между ядром и цитоплазмой. Но здесь флуоресценция p53 была менее интенсивной (рис. 1). Вестерн-блот анализ подтверждает данные иммунофлуоресцентной микроскопии (рис. 2).



**Рис. 3.** Количество TUNEL-положительных клеток в конралатеральном и ипсилатеральном DRG контрольной и экспериментальных групп животных после перерезки седалищного нерва. (А) – Иммунофлуоресцентная микроскопия срезов DRG, окрашенных TUNEL. (Б) – Количество TUNEL-положительных нейронов. (В) – Количество TUNEL-положительных ГК. Достоверность отличий: \*\*\* –  $p < 0.001$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \* –  $p < 0.05$ , относительно конралатерального DRG внутри одного животного; ### –  $p < 0.01$ ; # –  $p < 0.05$ , относительно ипсилатерального DRG контрольной группы.  $n = 6$ .

Эти данные согласуются с прошлыми исследованиями, в которых было показано, что NO является мощным индуктором экспрессии p53. На ранних сроках NO приводит к уменьшению уровня Mdm2, снижая убиквитинирование и последующую протеосомную деградацию p53, что может быть одним из механизмов его накопления при АТ при высоком уровне NO.

Также в нашем исследовании было показано, что NO ответственен за гибель нейронов и ГК крысы при АТ (рис. 3). Через 7 суток после АТ количество апоптотических нейронов и ГК значительно увеличивается относительно 24 часов, причем SNP достоверно увеличивает эту тенденцию, а SMT снижает её, проявляя нейропротекторный эффект (рис. 3). Количество TUNEL-положительных нервных клеток и ГК

ипсилатеральных ганглиев групп с применением SNP и SMT относительно ипсилатерального DRG контрольной группы в первом случае увеличилось в 1.8 раза и 30%, а во втором – уменьшилось в 1.7 раз и 25%, соответственно (рис. 3Б, В). Полученные нами данные свидетельствуют, что в гибели нейронов и ГК при АТ большую роль играет NO, а в частности его индуцибельная гиперпродукция. Механизмами, реализующими апоптоз нейронов и ГК, могут быть, как NO-зависимый нейротоксический ответ глии, окислительный стресс, вызванный гиперпродукцией ONOO- через активацию iNOS, так и активация p53 сигнального пути NO.

Таким образом, эксперименты с NO-донором и ингибитором iNOS продемонстрировали NO-зависимые механизмы экспрессии и локализации p53 в нейронах и ГК, а также гибели этих клеток при аксотомии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта «Наука-2030».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hill C.S.; Coleman M.P.; Menon D.K. // Trends Neurosci. 2016. 39: 311-24.
2. Kim M.K.; Yoon C.S.; Kim S.G. et al. // Sci. Rep. 2019. 9: 3379.
3. Savastano L.E.; Laurito S.R.; Fitt M.R. et al. // J. Neurosci. Meth. 2014. 227: 166-80.
4. Faden A.I., Yakovlev A.G. // Mol. Neurobiol. 2001. 24: 131-44.

## ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ В МЕХАНИЗМАХ КЛЕТочНОЙ ЗАЩИТЫ ОТ ЛИПОТОКСИЧНОСТИ И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

*Парнова Р.Г., Фок Е.М., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Липидные гранулы (ЛГ) - особые клеточные органеллы, представляющие собой окруженное монослоем фосфолипидов ядро из триацилглицеринов (ТАГ) и эфиров холестерина. Метаболизм ЛГ регулируется активностью огромного разнообразия белков, локализованных на поверхности этих структур. ЛГ обнаруживаются в том или ином количестве почти во всех типах клеток эукариот. Депонирование жирных кислот в составе ТАГ как энергетического запаса далеко не единственная задача ЛГ: они являются резервом строительных блоков для мембран клетки, участвуют в процессе аутофагии, регулируют уровень биоактивных липидов и играют центральную роль в клеточном

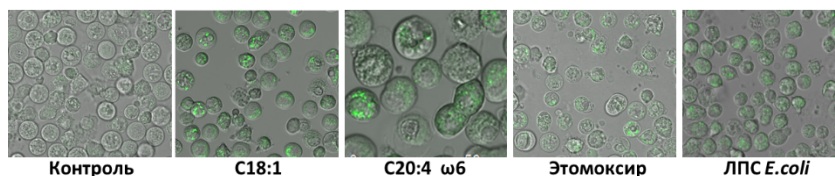
метаболизме липидов [1,2]. ЛГ обладают важной протекторной функцией, защищая клетку от токсического действия избытка липидов в цитозоле, в том числе свободных жирных кислот [3], а также препятствуют активации перекисного окисления липидов, «упрятывая» полиненасыщенные жирные кислоты в ТАГ ЛГ. Такой механизм антиоксидантной защиты был продемонстрирован на нейробластах мозга дрозофил, подвергнутых окислительному стрессу: ЛГ, формирующиеся в соседних глиальных клетках, включают в свой состав полиеновые жирные кислоты, транспортируемые из нейробластов, препятствуя таким образом перекисному окислению липидов и способствуя выживанию и пролиферации нейробластов [4]. Усиление биогенеза ЛГ подробно исследовано при действии экзогенных жирных кислот. Данная работа, выполненная на эпителиальных клетках, посвящена исследованию роли ЛГ как буферных систем, обеспечивающих защитную реакцию клетки на экспериментальные воздействия, приводящие к изменениям метаболизма эндогенных жирных кислот. Мы также попытались выяснить, задействована ли в данном типе клеток стратегия «упрятывания» полиненасыщенных жирных кислот в ЛГ в условиях окислительного стресса.

**Методы.** Работа выполнена на первичной культуре эпителиальных клеток, выделенных из мочевого пузыря лягушки. Подробно методы выделения и культивирования клеток описаны нами ранее [5]. Для визуализации липидных гранул и оценки количественных изменений был применен флуоресцентный краситель нильский красный (Invitrogen, США), позволяющий в диапазоне длин волн 510-590 нм анализировать содержание нейтральных липидов – ТАГ и эфиров холестерина. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (цитометр Coulter Epics XL, Beckman Coulter,  $\lambda_{\text{возб.}}$  488 нм,  $\lambda_{\text{эм.}}$  575 ± 15 нм) и конфокальной микроскопии (микроскоп Leica TCS SP5 MP,  $\lambda_{\text{возб.}}$  488 нм,  $\lambda_{\text{эм.}}$  515-560 нм, объектив ×20 с масляной иммерсией). Липидный анализ осуществляли, экстрагируя клеточные липиды по методу Фолча с последующим разделением на классы тонкослойной хроматографией и денситометрическим анализом [5]. Для расчета абсолютного количества ТАГ параллельно на пластинку наносили аликвоту раствора триолеина с известной концентрацией. Для анализа липидного метаболизма клетки культивировали 1 час с [5,6,8,9,11,12,14,15]<sup>3</sup>H(N)-арахидоновой кислотой с удельной активностью 100 Ки/ммоль или с [9, 10 – <sup>3</sup>H(N)]-олеиновой кислотой с удельной активностью 45.5 Ки/ммоль (Perkin Elmer, США). Липидный экстракт разделяли ТСХ. Зоны, соответствующие классам липидов, вырезали и измеряли в них уровень радиоактивности. Окисление олеиновой кислоты анализировали по оценке радиоактивности внеклеточной среды после экстракции гидрофобных компонентов смесью хлороформ-метанол 2:1. Жирнокислотный состав липидов анализировали

методом ГЖХ на хроматографе РУЕ-104 (модель 24, Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором. Этомоксир, диклофенак натрия или ЛПС *E. coli* (серотип 0127:B8) (Sigma, США) добавляли в концентрациях 100 мкМ, 250 мкМ и 25 мкг/мл, соответственно, длительность инкубации составляла 21 ч. Концентрацию ПГЕ<sub>2</sub> определяли с помощью набора Assay Designs Correlate-EIA™ Prostaglandin E<sub>2</sub> kit (Amersham, Англия). Выживаемость клеток оценивали МТТ-тестом. Скорость поглощения кислорода измеряли полярографически с использованием закрытого платинового электрода типа Кларка на анализаторе «Эксперт-001» (НПО «Эконикс эксперт», Россия) при 23°C в условиях постоянного перемешивания.

**Результаты и обсуждение.** Нами были применены следующие экспериментальные воздействия: инкубация клеток с экзогенными жирными кислотами различной структуры, торможение входа жирных кислот через наружную мембрану митохондрий этомоксиром, ингибитором карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 (СРТ-1), ингибирование диклофенаком циклооксигеназы, обеспечивающей окислительное превращение арахидоновой кислоты в эйкозаноиды, и инкубация клеток с ЛПС *E. coli*.

Суточная инкубация клеток с олеиновой С18:1, арахидоновой С20:4ω6 жирными кислотами (обе в дозе 50 мкМ), этомоксиром (100 мкМ) и ЛПС (25 мкг/мл) приводила к усилению биогенеза ЛГ (рис. 1), которые визуализируются конфокальной микроскопией как цитозольные включения разного размера, присутствующие в разном количестве практически во всех клетках, неравномерно распределяясь в цитоплазме.



**Рис. 1.** ЛГ, окрашенные нильским красным, в эпителиальных клетках в контроле, после инкубации с С18:1, С20:4ω6, этомоксиром и ЛПС *E. coli*. Данные конфокальной микроскопии.

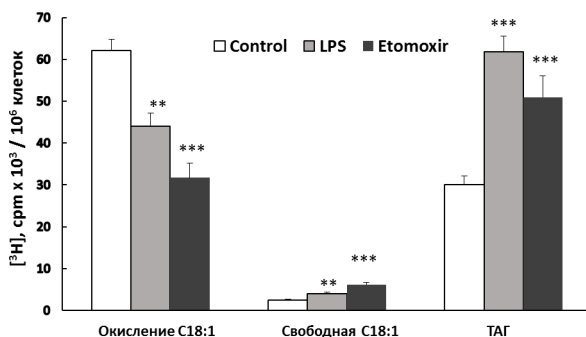
Количественная оценка внутриклеточного содержания ТАГ показала, что использованные воздействия приводят к увеличению абсолютного содержания ТАГ (данные не показаны), при этом количество эфиров холестерина не изменялось. Для выяснения того, связано ли увеличение количества ТАГ при действии экзогенных жирных кислот с усилением их включения в синтез ТАГ, были проведены эксперименты с использованием [<sup>3</sup>H]-С18:1 и [<sup>3</sup>H]-С20:4ω6 по инкубации клеток с трейсерными или нагрузочными (16 мкМ) количествами жирных кислот.

Экзогенные жирные кислоты включались во все исследованные классы липидов, однако, соотношение их включения в отдельные классы уже через 5 мин резко изменялось в сторону усиления синтеза ТАГ при использовании жирных кислот в микромолярных концентрациях по сравнению с их присутствием в трейсерных (наномолярных) количествах (данные не показаны).

Торможение окислительного превращения арахидоновой кислоты в эйкозаноиды диклофенаком приводило не к ее обратному переацилированию в фосфолипиды, как ожидалось, а к перенаправлению в ЛГ на синтез ТАГ (табл. 1).

**Табл. 1.** Действие диклофенака на метаболизм [<sup>3</sup>H]-арахидоновой кислоты в эпителиальных клетках (n = 6, \*\* – p < 0.01, \*\*\* – p < 0.001).

	Контроль	Диклофенак, 250 мкМ
Концентрация ПГЕ <sub>2</sub> во внеклеточной жидкости, пг/10 <sup>6</sup> клеток	3382 ± 272	230 ± 39**
Включение [ <sup>3</sup> H]-C20:4ω6 в ТАГ, срм/10 <sup>6</sup> клеток	766 ± 25	2704 ± 153***
Включение [ <sup>3</sup> H]-C20:4ω6 в фосфолипиды, срм/10 <sup>6</sup> клеток	3045 ± 156	2953 ± 64 (NS)



**Рис. 2.** Эффект ЛПС (25 мкг/мл) и этомоксира (100 мкМ) на метаболизм [<sup>3</sup>H]-C18:1. Клетки предынкубировали 1 час с [<sup>3</sup>H]-C18:1, отмывали и инкубировали с указанными веществами 21 час. Представлены средние значения ± m, n = 6 опытов, \*\* – p < 0.01, \*\*\* – p < 0.001.

Резкое усиление включения [<sup>3</sup>H]-C18:1 в ТАГ наблюдалось в присутствии этомоксира или ЛПС (рис. 2). Эти эффекты основаны на перенаправлении жирных кислот на синтез ТАГ, которое, в свою очередь, является следствием снижения β-окисления жирных кислот (рис. 2), вызываемого разными механизмами. Этомоксир, ингибируя СРТ1,

тормозит вход жирных кислот в митохондрии. Действие ЛПС более сложно: в использованной нами дозе ЛПС не снижал жизнеспособности клеток и не влиял на митохондриальный мембранный потенциал, однако в его присутствии уменьшалась скорость поглощения кислорода и продукция АТФ. Снижение функции митохондрий при действии ЛПС обусловлено оксидативным стрессом и усилением продукции митохондриальных ROS, поскольку, как было показано нами ранее, эффект ЛПС на накопление ЛГ и снижение окисления жирных кислот устранялся в присутствии митохондриально-направленного антиоксиданта MitoQ [5]. Таким образом, эксперименты с этмоксиром и ЛПС показывают, что снижение окисления жирных кислот, обусловленное различными механизмами, неизменно приводит к их депонированию в составе ТАГ ЛГ.

Оценка жирнокислотного состава фосфолипидов и ТАГ показала, что при действии ЛПС, которое сопровождается увеличением уровня ROS, количество арахидоновой кислоты в фосфатидилхолине снижается с  $14 \pm 6.6\%$  до  $6.6 \pm 0.5\%$  ( $p < 0.05$ ), а в ТАГ увеличивается с  $10.6 \pm 2\%$  до  $30.2 \pm 4\%$  ( $p < 0.05$ ). Эти данные позволяют предположить существование антиоксидантной функции ЛГ в эпителиальных клетках, связанной с преимущественным перенаправлением в ТАГ полиненасыщенных жирных кислот при действии патологического стимула. Инкубация клеток с экзогенными жирными кислотами различной структуры с последующей оценкой уровня флуоресценции нильского красного проточной цитометрией показала, что при использовании жирных кислот в низкой дозе (10 мкМ) биогенез ЛГ стимулировался полиеновыми жирными кислотами (C20:4 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3, C20:3 $\omega$ 3), но не насыщенными (C18:0, C20:0) или моноеновыми (C18:1) (данные не показаны). Исследование дозозависимости влияния C18:1 и C20:4 $\omega$ 6 на биогенез ЛГ показало, что EC50 для C20:4 $\omega$ 6 составляет около 7 мкМ, а для C18:1 – 25 мкМ.

**Заключение.** Полученные результаты показали, что при различных экспериментальных воздействиях, приводящих теми или иными механизмами даже к незначительному повышению внутриклеточного уровня жирных кислот, неизменно происходит их перенаправление на депонирование в ЛГ. Значительно активнее в этот процесс вовлекаются полиненасыщенные жирные кислоты. Эти данные позволяют рассматривать ЛГ как важнейшую динамичную буферную систему, строго контролирующую внутриклеточный липидный гомеостаз, предохраняя клетку от развития липотоксичности и активации перекисного окисления липидов в ходе различных патологий.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания ИЭФБ РАН (№ 075-00967-23-00).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Walther T.C., Farese R.V. Jr.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. 1791(6): 459-66.
2. *Danielli M., Perme L., Jovicic E.J., Petan T.* // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2023. 11: 1104725.
3. *Listenberger L.L., Han X., Lewis S.E. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100(6): 3077-82.
4. *Bailey A.P., Koster G., Guillermier C. et al.* // *Cell.* 2015. 163(2): 340-53.
5. *Fock E., Bachtееva V., Lavrova E., Parnova R.* // *J. Lipids.* 2018. 5745790.

### ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ АФК В РЕДОКС-БАЛАНС КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНОВ СИНУКЛЕИНОВ

*Серёгина Е.С.<sup>1</sup>, Винокуров А.Ю.<sup>1</sup>, Чапров К.Д.<sup>2</sup>, Абрамов А.Ю.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева,  
Орел, Россия

<sup>2</sup>Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической  
физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия

**Введение.** Болезнь Паркинсона (БП) является одной из наиболее распространенных патологий среди первичных хронических нейродегенеративных заболеваний [1]. Семейство синуклеинов привлекло особое внимание нейробиологов, когда была обнаружена мутантная форма одного из его членов, альфа-синуклеина, в ряде семей с аутосомно-доминантной формой БП. Дальнейшие исследования показали, что альфа-синуклеин является основным компонентом характерных для БП гистопатологических включений – телец Леви, как при наследственных, так и спорадических формах болезни. При других нейродегенеративных заболеваниях агрегированные формы этого белка также являются основным компонентом этих патологических структур. Позже было показано участие синуклеинов в регуляции синаптической передачи [2,3].

Синуклеины (альфа, бета и гамма) представляют собой семейство высококонсервативных белков, специфичных для позвоночных, которые концентрируются в пресинаптических терминалах нейронов и, как считается, участвуют в регуляции везикулярного высвобождения и рециркуляции нейротрансмиттеров [4,5]. Конкретная биологическая функция синуклеинов остается неясной. Среди предложенных физиологических функций альфа-синуклеина – регуляция синаптической передачи, регуляция кальция, шаперонная активность и предотвращение окисления ненасыщенных липидов [6,7]. Кроме того, многочисленные доказательства свидетельствуют о том, что накопление альфа-синуклеина в митохондриях нарушает функцию комплекса I электрон-транспортной



цепи в дофаминергических нейронах [8,9]. Также, агрегация данного белка может приводить к повышению уровня окислительного стресса за счет нарушения регуляции редокс-систем организма [10,11]. Весьма существенные изменения окислительно-восстановительного баланса в клетках головного мозга с нокаутом одного или нескольких генов синуклеинов делает необходимым более детальное исследование вклада отдельных процессов в общую продукцию АФК в клетках. Роль других белков семейства синуклеинов в развитии процессов, связанных с образованием и нейтрализацией АФК, в настоящее время не достаточно изучена. Но можно сделать предположение о том, что эта роль может быть связана с участием бета- и гамма-синуклеинов как в реализации функций альфа-белка в норме и патологии, так и в иных процессах [13,14].

Очевидно, что одним из следствий приводящих к БП мутаций гена альфа-синуклеина (а возможно и генов других белков данного семейства), является дефицит функций белка нормального строения. В связи с этим одной из стратегий изучения ассоциированных с синуклеинами изменений метаболизма, включая изменения окислительно-восстановительного баланса, является применение животных моделей с нокаутом одного или нескольких генов данных белков.

Целью данной работы является изучение вклада различных источников АФК в обеспечение редокс-баланса или развитие окислительного стресса в клетках головного мозга мышей с нокаутом генов синуклеинов.

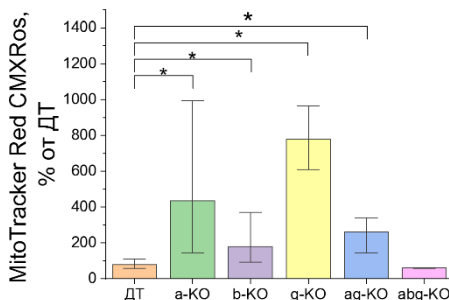
**Материалы и методы.** Для формирования экспериментальных групп использовали самцов линий мышей с генетической инактивацией генов синуклеинов: одиночный нокаут по гену альфа- (a-KO), бета- (b-KO) и гамма- (g-KO) синуклеинам, двойной нокаут по альфа- и гамма-синуклеину (ag-KO) и тройной нокаут по генам альфа-, бета- и гамма-синуклеину (abg-KO), а в качестве контрольной группы (ДТ) были выбраны мыши линии C57Bl/6J без генетических модификаций, полученные при становлении линий нокаутов синуклеинов. Острые срезы среднего мозга мышей толщиной 0.4-0.6 мм анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия).

Изучение продукции АФК в митохондриях, а также продукции цитозольных АФК проводили с использованием MitoTracker Red CM-H2XRos и HEt соответственно. Во втором случае в целях определения вклада НАДФН-оксидаз и моноаминоксидаз (МАО) исследованию подвергали как необработанные срезы, так и срезы, которые инкубировали в присутствии соответствующих ингибиторов – DPI (0.5 мкМ) и селегилина (20 мкМ). Кроме того, для более детального изучения митохондриальной продукции АФК были выполнены исследования после предварительного инкубирования срезов в 0.5 мкМ растворе FCCP. Для оценки роли отдельных источников в общую продукцию АФК при нокауте

того или иного гена синуклеинов рассчитывали изменение скорости окисления HEt относительно базового уровня для срезов головного мозга животных этой же экспериментальной группы.

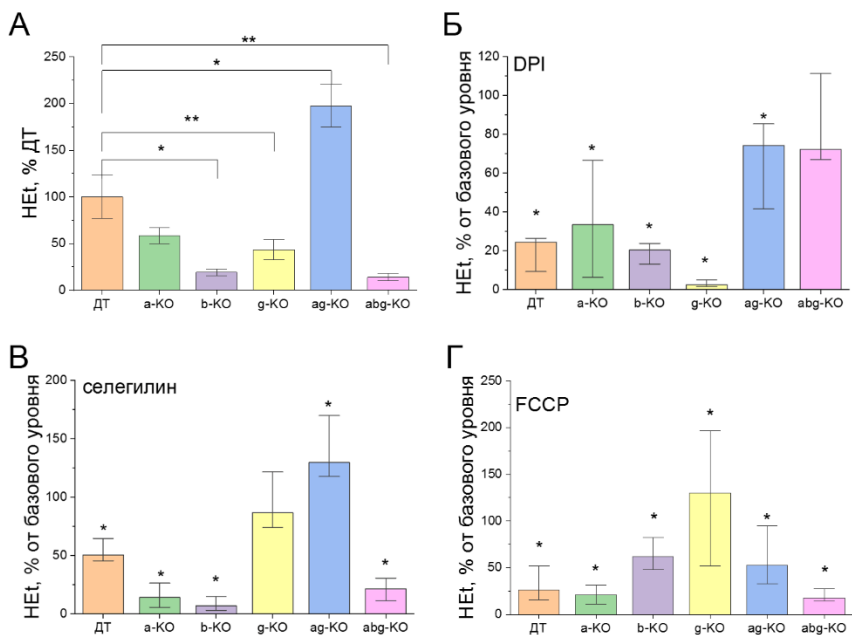
Оценку внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона (GSH) проводили путем инкубирования клеток в течение 30 минут в 50 мкМ растворе монохлорбимана (МСВ).

**Результаты.** Отсутствие синуклеинов в клетках весьма неоднозначно сказывается на митохондриальной продукции АФК, что представлено на рисунке 1. Для всех животных с нокаутом одного из трех белков выявлено статистически значимое увеличение скорости образования АФК в митохондриях (в 4.4; 1.8 и 7.8 раза относительно животных ДТ), что говорит о весьма существенной роли синуклеинов в регуляции митохондриального метаболизма. Отсутствие в клетках двух белков (а-КО и g-КО) приводит к более низкой скорости образования митохондриальных АФК относительно экспериментов с нокаутом этих синуклеинов по отдельности, но повышенной в сравнении с контролем. В то же самое время нокаут все трех синуклеинов ведет к некоторому снижению исследуемого параметра.



**Рис. 1.** Продукция митохондриальных АФК в срезах головного мозга мышей ДТ и мышей с нокаутом генов синуклеинов (\* –  $p = 0.05$ ).

Влияние нокаута отдельных генов белков семейства синуклеинов на продукцию АФК в цитозоле клеток весьма различно (рис. 2А). В случае индивидуальных нокаутов а-КО, b-КО и g-КО, а также группы abg-КО обнаружено снижение базовой скорости окисления зонда (соответственно 62.3%, 15.4%, 33.3% и 17.9% от срезов коры мозга животных ДТ). В то же время одновременное отсутствие экспрессии генов в группе ag-КО в 1.8 раза увеличивало скорость продукции цитозольных АФК. Результаты исследований скорости окисления HEt с применением ингибиторов продуцирующих АФК ферментов, а также митохондриального разобщителя свидетельствуют о различном характере вклада данных источников в общую продукцию АФК в клетках (рис. 2Б-Г).

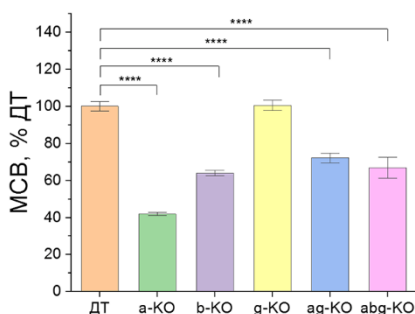


**Рис. 2.** Сравнительная оценка скорости окисления NEt (А) и скорость окисления NEt в срезах коры головного мозга мышей ДТ и мышей с нокаутом генов синуклеинов в присутствии ингибитора НАДФН-оксидазы DPI (Б), ингибитора MAO селегилина (В) и митохондриального разобщителя FCCP (Г). \* –  $p = 0.05$ , \*\* –  $p = 0.01$  (относительно базового уровня для каждого типа срезов без внесения добавок, принятого за 100%).

В срезах коры головного мозга животных ДТ наблюдается достаточно высокий вклад как НАДФН-дегидрогеназ, так и MAO в продукцию АФК (снижение скорости окисления NEt в присутствии DPI и селегилина относительно базового уровня: 75.6% и 49.7% соответственно). В тканях мышей групп a-KO b-KO на сопоставимом с контролем уровне сохраняется роль НАДФН-дегидрогеназ, однако значительно возрастает количество АФК, образующихся в результате функционирования MAO (для a-KO и b-KO снижение под действием селегилина составило 86.0% и 93.2% соответственно), что свидетельствует о высоком уровне метаболизма моноаминов в клетках мозга этих животных. В то же время роль данного фермента практически полностью снижена в случае g-KO и ag-KO (в последнем случае скорость продукции АФК в присутствии селегилина оказалась даже выше базового значения). Кроме того, в срезах мышей из группы g-KO весьма существенно повышен вклад НАДФН-оксидаз (присутствие DPI привело к 97.6%-ному падению

скорости окисления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), что коррелирует с высокой продукцией митохондриальных АФК в клетках этих же животных (рис. 1). Важно отметить, что сочетание двух или трех нокаутов привело к значительному снижению ответа на DPI исследованного параметра, что говорит об уменьшении уровня экспрессии или активности НАДФН-оксидаз. Обусловленное FCCSR мягкое разобшение приводило к ожидаемому снижению продукции АФК в срезах головного мозга всех групп мышей за исключением группы g-KO, что наряду с данными, приведенными на рисунке 1, свидетельствует о весьма значительных изменениях функционирования ЭТЦ митохондрий в этом случае.

Чтобы оценить, в какой степени выявленные изменения оказывают влияние на поддержание в тканях окислительно-восстановительного баланса, было проанализировано содержание GSH, результаты которого приведены на рисунке 3.



**Рис. 3.** Результаты статистического анализа интенсивности флуоресценции конъюгатов МСВ с GSH в острых срезах коры головного мозга мышей ДТ, а также мышей с нокаутом одного или нескольких генов синуклеинов (\*\*\*\* –  $p = 0.0001$ ).

В то время как содержание GSH в срезах мозга животных с нокаутом гамма-синуклеина статистически не отличается от контроля, в срезах мозга остальных животных он значительно снижен (для a-KO, b-KO, ag-KO и abg-KO соответственно 40.7%, 60.4%, 65.7%, 60.6%).

Совокупность данных о продукции АФК в тканях исследованных групп модельных животных позволяет говорить о весьма сложной регуляции окислительно-восстановительного баланса с участием синуклеинов и высокой взаимосвязи между их функциями, в результате чего связанные с мутациями отсутствие или дисфункция одного из синуклеинов может привести к компенсации со стороны другого или, наоборот, стать причиной патологических процессов, приводящих к нарушениям состояния клеток. В случае нокаута альфа-, или бета-синуклеинов или тройного нокаута снижение скорости продукции АФК

положительно коррелирует с изменением содержания GSH. В то же время значительный рост окисления HET в тканях мозга мышей с двойным нокаутом сопровождается более чем 30%-ным падением уровня антиоксиданта, а низкий уровень образования АФК при наличии нокаута гамма-синуклеина соответствует неизменному содержанию GSH.

Можно предположить, что в физиологических условиях альфа- и бета-синуклеины могут участвовать в протекании окислительно-восстановительных процессов, которые обеспечивают регуляцию клеточного метаболизма, и нарушение их функций, приводящее к снижению продукции АФК, вызывает соответствующее понижение уровня GSH. В то же время в случае гамма-синуклеина наблюдается значительный сдвиг в сторону восстановительных условий внутриклеточной среды. Эффект двойного нокаута альфа- и гамма-синуклеина, вероятно, связан с нарушениями в обеспечении антиоксидантной системы клеток, что выражается в преобладании образования АФК над их нейтрализацией. Полученные результаты являются частью работы по изучению патогенеза наследственных форм БП, в том числе синуклеинопатий, и служат основой для выявления функций синуклеинов в живом организме, а также для прогнозирования и реализации механизмов защиты клеток от патологического воздействия окислительного стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15-2022-1095.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Poewe W., Seppi K., Tanner C.M. et al. // Nat. Rev. Dis. Primers. 2017. 3: 17013.
2. Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. // Trends Neurosci. 2010. 33(12): 559-68.
3. Sulzer D., Edwards R.H. // J. Neurochem. 2019. 150(5): 475-86.
4. Lavedan C. // Genome Res. United States, 1998. 8(9): 871-80.
5. Vorobyov V., Deev A., Sukhanova I. et al. // Biomedicines. 2022. 10(12): 3128.
6. Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I. et al. // Neuron. 2000. (25)1: 239-52.
7. Burré J. // J. Parkinsons. Dis. 2015. 5: 699-713.
8. Chinta S.J. Mallajosyula J.K., Rane A., Andersen J.K. // Neurosci. Lett. 2010. 486(3): 235-9.
9. Abramov A.Y., Angelova P.R. // Biochem. Soc. Trans. 2019. 47(6): 1963-9.
10. Scudamore O., Ciossek T. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2018. 77(6): 443-53.
11. Klivenyi P., Siwek D., Gardian G. et al. // Neurobiol. Dis. 2006. 21(3): 541-8.
12. Orth M., Tabrizi S.J., Tomlinson C. et al. // Neurochem. Int. 2004. 45(5): 669-76.
13. Dolgacheva L.P., Fedotova E.I., Abramov A.Y., Berezhnov A.V. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2018. 12(1): 10-9.
14. Fan Y. et al. // Hum. Mol. Genet. 2006. 15(20): 3002-11.

## АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ С-МУС ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

*Хайтин А.М.<sup>1</sup>, Бачурин С.С.<sup>2</sup>, Демьяненко С.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Лаборатория «Молекулярная нейробиология» Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup>Кафедра общей и клинической биохимии № 2 Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

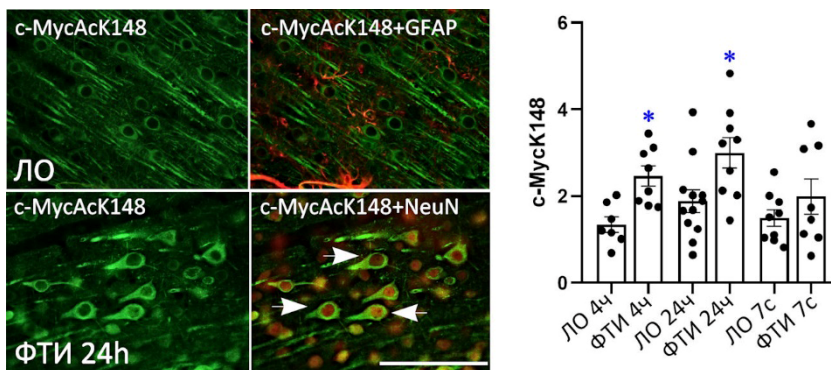
**Введение.** Белок с-Мус функционирует как нижестоящий центральный узел внутри ядра клетки, интегрируя сигналы от многочисленных вышестоящих путей, контролируя экспрессию 10-15% всех генов, участвующих в регуляции энергетического обмена, синтезе белка, онкогенезе, клеточном цикле и апоптозе. Как правило, рост экспрессии с-Мус способствует апоптотической гибели клеток [1]. В ЦНС функции с-Мус противоречивы. С одной стороны, рост экспрессии с-Мус в нейронах не вызывает их пролиферации, а приводит к гибели нейронов и последующему развитию нейродегенеративного фенотипа [2]. Соответственно, существует множество механизмов, которые блокируют экспрессию с-Мус и его активность именно в головном мозге. Однако, было показано, что увеличение уровня с-Мус способствует восстановлению периферических нервов после травмы [2], что делает с-Мус полезным инструментом для регенерации клеток мозга после острого повреждения. Стабильность и активность с-Мус во многом зависит от его посттрансляционных модификаций. Известно, что ацетилирование с-Мус ацетилтрансферазой PCAF по лизину 323 повышает его стабильность в раковых клетках, защищая белок от убиквитин-зависимого протеолиза, а также способствует ассоциации с-Мус с его партнером Max, что необходимо для его активации [3]. О том, как изменяется уровень и паттерн ацетилирования с-Мус в нервных клетках после острого или хронического повреждения практически неизвестно. В связи с этим, целью работы явилось изучение изменения экспрессии с-Мус, его клеточного и внутриклеточного распределения, ацетилирования с-Мус и конформационных изменений, вызванных ацетилированием белка после ишемии.

**Результаты.** Проведенное нами исследование содержания с-Мус методом вестерн-блот не выявило изменения в содержании белка как в цитоплазматической, так и в ядерной фракциях ткани периферической области фототромботического инсульта (ФТИ) у крыс в первые сутки и в период восстановления (7 суток). При этом, в ядерной фракции содержание белка было выше, чем в цитоплазматической на всех сроках исследования. Иммунофлуоресценция с-Мус в клетках коры мозга

ложнооперированных животных не высока. О статистически значимом росте уровня с-Мус в нейронах пенумбры можно говорить только в первые сутки после ФТИ, но не в период восстановления. Не удалось обнаружить с-Мус в астроцитах, макрофагах или микроглии перифокальной области ФТИ.

Известно, что с-Мус состоит из N-концевого домена трансактивации (TAD), последовательности ядерной локализации (NLS) и внутренне неупорядоченного C-концевого участка, содержащего домен bHLHZip вместе с сайтами связывания ключевых партнеров белка, а также ДНК-связывающие домены. В открытой базе данных UniProt был проведен поиск ацетилтрансфераз и деацетилаз, способных ацетилировать/деацетилировать с-Мус, а с помощью программы GPS-PAIL 2.0. поиск возможных сайтов ацетилирования с-Мус. Проведенный анализ позволил выделить наиболее важные сайта ацетилирования с-Мус для исследований *in vivo*. На модели ФТИ у крыс была проведена оценка изменения уровня ацетилирования с-Мус по лизинам в положении 148 (TAD) и 323 (NLS).

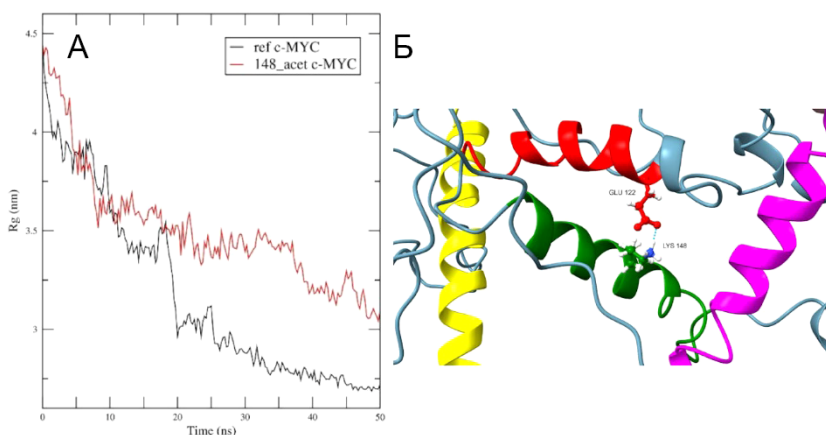
с-Мус, ацетилированный по K148 (149) содержится в ядрах, но в большей степени в цитоплазме клеток коры мозга крыс (рис. 1). Через 4 часа после ФТИ уровень с-МусAcK148 увеличивается в цитоплазме нейронов перифокальной области ФТИ и уже через 24 часа уровень с-МусAcK148 превышает контрольный более чем в 2 раза (рис. 1).



**Рис. 1.** Иммунофлуоресценция с-МусAcK148 (зеленый), маркера нейронов NeuN (красный), наложение изображений с-МусAcK148 с NeuN, с-МусAcK148 и Noeschst33342 (маркер ядер, синий). Масштабная линейка 100 мкм. Стрелки – нейроны с с-МусAcK148. График изменения иммунофлуоресценции с-МусAcK148 в относительных единицах в клетках перинфарктной области в разные сроки после ФТИ и в коре ложнооперированных крыс (ЛО). One-way ANOVA.  $M \pm SEM$ .  $n = 6-10$ . \*  $p < 0.05$  относительно показателей у ЛО.

В восстановительный период содержание с-МусAcK148 в клетках пенумбры не превышает контрольные значения. В отличие от с-МусAcK148 ацетилированный с-Мус по K323 имел преимущественно ядерную локализацию в нейронах. Уровень ацетилирования с-Мус по K323 не изменялся ни в острый период, ни в период восстановления после ФТИ.

Для того, что понять, как ацетилирование с-Мус по лизину 148 отразится на конформации белка и его стабильности была проведена молекулярно-динамическая симуляция (MDS). MDS проводилась в программе GROMACS [<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>]. В качестве стартовой модели использовалась модель белка с-Мус с ресурса UNIPROT (AF-P01106-F1-model\_v4), полученная с помощью алгоритма AlphaFold [<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>]. На основе неё была получена геометрия, в которой лизин в 148 положении является ацетилированным по аминогруппе. Оценивались среднеквадратичные отклонения координат белка относительно стартовой структуры, изменение радиуса гирации во времени, а также проанализированы геометрии каждой модели в финальной точке симуляции с выравниванием относительно друг друга.



**Рис. 2.** А) Изменение радиуса гирации. Черный цвет – не модифицированный с-Мус, красный цвет – ацетилированный с-Мус по лизину 148. Б) Водородная связь между 148 лизином и 122 глутамином в не ацетилированном с-Мус.

В обеих моделях ацетилированная и не ацетилированная форма с-Мус в районе 148 лизина было проанализировано распределение водородных связей. Графики изменения радиуса гирации свидетельствуют о том, что не модифицированный с-Мус компактизуется гораздо быстрее и сильнее, чем ацетилированный (рис. 2А). Результаты анализа геометрий



наглядно показывают, что ацетилирование лизина в 148 положении приводит к значительной конформационной перестройке с-Мус: в связи с невозможностью образовать водородную связь с глутамином (122) противоположной альфа спирали, происходит переориентация альфа цепей (рис. 2Б). Исходя из общего характера конформационной перестройки напрашивается вывод, что ацетилирование является такой формой пост-трансляционной модификации белка с-Мус, которая позволяет реорганизовать альфа-спирали относительно друг друга в новый паттерн. По-видимому, такая реорганизация не случайна и различные конформации с-Мус в результате точечного ацетилирования приводят к образованию различных доменов связывания с регуляторными или функциональными белками. Эта гипотеза требует дальнейшей проверки на моделях докинга различных форм с-Мус с белками кандидатами.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Uzdensky A.B.* // Apoptosis. 2019. 24(9-10): 687-702.
2. *Marinkovic T., Marinkovic D.* // Mol. Neurobiol. 2021. 58(8): 4169-77.
3. *Nebbioso A., Carafa V., Conte M. et al.* // Clin. Cancer Res. 2017. 23(10): 2542-55.

\*\*\*

# ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА МА-[D-Leu4]-ОВЗ НА ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС

*Бахтюков А.А., Лебедев И.А., Кузнецова В.С., Фокина Е.А.,  
Деркач К.В., Шнаков А.О.*

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Способность стероидогенных клеток Лейдига семенников синтезировать и секретировать мужской половой гормон тестостерон регулируется гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (ГГТ) системой. Гонадолиберин (GnRH), экспрессируемый GnRH-нейронами гипоталамуса, усиливает секрецию гонадотропинов гонадотрофами аденогипофиза, которые в свою очередь стимулируют синтез тестостерона. Среди регуляторов тестикулярного стероидогенеза особое место занимают адипокины, гормоноподобные вещества, секретлируемые жировой тканью. В настоящее время наиболее изучено влияние на тестикулярный стероидогенез хорошо известного анорексигенного гормона лептина [1]. Показано, что лептин может стимулировать секрецию GnRH опосредованно, влияя на активность нейронов, экспрессирующих целый ряд нейропептидов (POMC, CART, NPY, AgRP, кисспептин, динорфин и нейрокинин), вовлеченных в регуляцию синтеза и секреции GnRH. Кроме того, лептин оказывает модулирующее влияние на стероидогенез и сперматогенез, действуя на свои рецепторы в мембране клеток Лейдига семенников. Однако до сих пор остается неясным, каков вклад центральных и периферических эффектов лептина в регуляцию синтеза тестостерона. Литературные данные показывают, что повышенный уровень лептина в крови, как и развитие лептиновой резистентности оказывает негативное влияние на секрецию GnRH, гонадотропинов и тестостерона и наряду с такими показателями как высокий уровень провоспалительных цитокинов, инсулиновая резистентность и гипергликемия может стать причиной андрогенной недостаточности при некоторых метаболических расстройствах [2]. Поскольку поиск регуляторов тестикулярного стероидогенеза на основе лептина и его аналогов представляет большой интерес в контексте их антидиабетических эффектов, актуальной задачей также представляется комплексное изучение того вклада, который оказывает лептин на каждый

из компонентов ГГТ оси. В связи с этим, одним из перспективных подходов является использование фрагментов лептина, представляющих собой участок молекулы адипокина, ответственный за связывание с рецептором и его активацию. Одним из наиболее изученных веществ является N-концевой фрагмент лептина 116 – 122 МА-[D-Leu4]-ОВЗ [3]. Показан анорексигенный эффект МА-[D-Leu4]-ОВЗ и его аналогов на метаболические показатели на моделях генетически-обусловленного и диета-индуцированного ожирения мышей [3,4]. Однако данные как о возможном влиянии МА-[D-Leu4]-ОВЗ на компоненты гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, так и о механизмах этого влияния в литературе полностью отсутствуют. Также остается неясным, каким образом этот препарат может реализовать свои эффекты, действуя на центральное звено гонадной оси (гипоталамус) или непосредственно на периферические ткани-мишени (семенники).

Целью настоящей работы было изучить влияние препарата МА-[D-Leu4]-ОВЗ при интраназальном способе введения на уровень тестостерона в крови и экспрессию генов, ответственных за стероидогенез в семенниках крыс в норме и на фоне подавления секреции гонадотропинов с помощью антагониста рецептора GnRH цетрореликса (ЦЕТ) и стимуляции стероидогенеза с помощью хорионического гонадотропина (ХГЧ).

**Методика.** Для экспериментов использовали половозрелых самцов крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Все процедуры осуществляли в строгом соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 7-3/2020), «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС).

Животные были разделены на 8 групп (n = 6). Фрагмент лептина МА-[D-Leu4]-ОВЗ (Миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амид, Atagenix Laboratories, КНР) растворяли в физрастворе и вводили крысам из групп «ОВЗ» и «ОВЗ+ХГЧ», «ЦЕТ+ОВЗ» и «ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ» интраназально в дозе 200 мкг/крысу в течение трех дней в 11.00. Антагонист рецептора GnRH (ЦЕТ, Cetrorelix acetate, КНР) растворяли в физрастворе и вводили крысам из групп «ЦЕТ», «ЦЕТ+ОВЗ», «ЦЕТ+ХГЧ», «ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ» подкожно в дозе 75 мг/кг в течение трех дней в 11.00. Крысам из групп «ОВЗ+ХГЧ», «ХГЧ», «ЦЕТ+ХГЧ» и «ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ» в последний день эксперимента подкожно вводили препарат «хорионический гонадотропин» (ХГЧ, Московский эндокринный завод, Россия) в дозе 15 МЕ/крысу в 12.30 (через 1.5 ч после МА-[D-Leu4]-ОВЗ). Животные из группы «Контроль» получали физраствор вместо препарата. На третий день введения МА-[D-Leu4]-ОВЗ у крыс брали кровь до введения этого препарата и/или

ЦЕТ (в 10.00), через 1.5 ч после введения MA-[D-Leu4]-OB3 и/или ЦЕТ, через 1.5 и 3 ч после введения ХГЧ. Затем животные подвергались общей анестезии с помощью хлораль гидрата (400 мг/кг) и были декапитированы. Ткани семенников были извлечены и заморожены при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Уровень тестостерона в образцах плазмы крови крыс определяли с помощью иммуноферментного анализа («ИФА-Тестостерон», «Алкор-Био», Россия). Для анализа экспрессии генов из тканей семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента «ExtractRNA» («Евроген», Россия), затем получали кДНК с помощью реакции обратной транскрипции («MMLV RT Kit», «Евроген», Россия). ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью амплификатора «Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System» («Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в смеси, содержащей кДНК, 0.4 мкМ прямого и обратного специфичных праймеров, реагент «qPCR-HS SYBR+Low ROX» («Евроген», Россия). В работе использовали последовательности комплементарных кДНК прямого и обратного праймеров для генов крысы: Forward CTGCGCTGTCCTGGCC и Reverse CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA для гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ, Forward AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC и Reverse CACCTGGCACCACCTTACTT для гена *Star*, кодирующего стероидогенный холестерин-транспортирующий белок StAR, Forward TATCCGCTTTGCCTTTGAG и Reverse CACGATCTCCTCCAACATCC для гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450<sub>scc</sub> и отвечающего за регуляцию начальной стадии стероидогенеза, преобразования холестерина в прегненолон, а также Forward CTGGCACCACACCTTCTACA и Reverse AGGTCTCAAACATGATCTGGGT для гена *Actb*, используемого в качестве референсного и кодирующего β-актин [5].

Статистическую обработку данных по уровню тестостерона в крови проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки для попарного сравнения. Для статистической обработки данных по генной экспрессии использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки для попарного сравнения. Все статистические анализы проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (версия 8.0.1).

**Результаты и их обсуждение.** Нами было показано, что предобработка крыс в течение трех дней MA-[D-Leu4]-OB3 усиливает стероидогенный эффект ХГЧ на уровень тестостерона в крови самцов крыс через 1.5 и 3 ч после его однократного введения. Ранее нами было показано, что известный антидиабетический препарат метформин способен усиливать стероидогенный эффект однократного введения ХГЧ [5,6]. В настоящем исследовании однократное подкожное введение ХГЧ (15 МЕ/крысу) вызвало повышение уровня тестостерона на 243% через 3 ч

после введения. Трехдневное интраназальное ведение МА-[D-Leu4]-ОВЗ в дозе 200 мкг/крысу приводило к усилению эффекта ХГЧ на уровень тестостерона в крови крыс уже через 1.5 ч после введения гонадотропина на 340%, а через 3 ч стероидогенный эффект достигал 773%. При этом нами не было отмечено стероидогенного эффекта самого препарата МА-[D-Leu4]-ОВЗ, введенного крысам в течение трех дней. Таким образом, обработка МА-[D-Leu4]-ОВЗ вызывала потенцирование эффекта ХГЧ на 66 и 221% через 1.5 и 3 ч после введения гонадотропина.

**Табл. 1.** Влияние трехдневного введения МА-[D-Leu4]-ОВЗ (ОВЗ) и(или) цетрореликса (ЦЕТ), а также однократного введения ХГЧ на уровень тестостерона в крови самцов крыс.

Название группы	Базовый уровень тестостерона	1.5 ч после МА-[D-Leu4]-ОВЗ или ЦЕТ	3 ч после МА-[D-Leu4]-ОВЗ или ЦЕТ и 1.5 ч после ХГЧ	4.5 ч после МА-[D-Leu4]-ОВЗ или ЦЕТ и 3 ч после ХГЧ
«Контроль»	10.55±1.35	15.99±1.20	10.27±1.21	8.05±1.38
«ОВЗ»	8.06±2.16	13.55±2.70	6.64±0.90	6.21±0.70
«ХГЧ»	8.34±1.13	16.72±2.70	22.49±1.81	28.60±4.95*
«ОВЗ+ХГЧ»	7.76±0.66	18.38±3.98	29.72±7.06*#	59.01±8.79*#&
«ЦЕТ»	13.89±6.21	14.55±6.50	4.98±2.23*	3.48±1.56*
«ЦЕТ+ОВЗ»	8.36±3.74	11.20±5.01	3.98±1.78*	2.70±1.21*
«ЦЕТ+ХГЧ»	13.06±5.84	9.85±4.40	5.27±2.35*	12.65±5.66*#&
«ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ»	9.76±4.36	7.23±3.23	4.80±2.15*	13.05±5.84*#&

**Примечание.** \* – отличия от базового уровня тестостерона при внутригрупповом сравнении, & – отличия от временной точки 3 ч после обработки МА-[D-Leu4]-ОВЗ и(или) ЦЕТ или через 1.5 ч после введения ХГЧ при внутригрупповом сравнении, # – отличия от аналогичной временной точки в группе «Контроль» статистически значимы при  $p < 0.05$ ,  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Регуляция синтеза тестостерона в клетках Лейдига семенников осуществляется через активацию эндогенными гонадотропинами рецептора ЛГ, что ведет к стимуляции активности белка StAR, транспортирующего холестерин из цитоплазмы в митохондрии к месту начала синтеза тестостерона, и цитохрома P450<sub>scc</sub>, катализирующего превращение холестерина в прегненолон. Далее прегненолон в серии последовательных реакций превращается в тестостерон [7]. Тем самым, гены, кодирующие рецептор ЛГ (*Lhr*), белок StAR (*Star*) и цитохром P450<sub>scc</sub> (*Cyp11a1*) являются ключевыми компонентами системы стероидогенеза. Нами показано, что обработка самцов крыс с помощью ХГЧ приводит к повышению экспрессии генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* в семенниках на 172, 168 и 74%, соответственно. (табл. 2). Трехдневное введение МА-[D-Leu4]-ОВЗ не приводило к усилению стимулирующего эффекта ХГЧ на экспрессию генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* (табл. 2).

**Табл. 2.** Изменение экспрессии генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* в ткани семенников крыс после введения МА-[D-Leu4]-ОВЗ, цетрореликса или ХГЧ.

Название группы	<i>Star</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Lhr</i>
«Контроль»	1.07 ± 0.18	1.03 ± 0.11	1.00 ± 0.02
«ОВЗ»	1.17 ± 0.13	0.92 ± 0.06	1.57 ± 0.16
«ХГЧ»	2.88 ± 0.41*#	1.79 ± 0.26*#	2.73 ± 0.66*
«ОВЗ+ХГЧ»	2.65 ± 0.31*#	1.35 ± 0.13	2.26 ± 0.22*
«ЦЕТ»	0.71 ± 0.07*	1.35 ± 0.20	2.71 ± 0.64*
«ЦЕТ+ОВЗ»	0.69 ± 0.06*	1.36 ± 0.18	1.83 ± 0.23*
«ЦЕТ+ХГЧ»	1.52 ± 0.32	1.86 ± 0.30*	2.82 ± 0.39*
«ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ»	1.01 ± 0.14	1.50 ± 0.47	1.73 ± 0.32&

**Примечание.** \* – отличия от группы «Контроль», & – отличия от группы «ЦЕТ+ХГЧ», # – отличия от группы «ОВЗ» статистически значимы при  $p < 0.05$ ,  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Общепринято, что определяющую роль в регуляции ГГТ-оси играют гипоталамические эффекты лептина [1]. Однако данные о механизмах и мишенях влияния МА-[D-Leu4]-ОВЗ на эту ось, в том числе информация о вовлечении в это влияние гипоталамических механизмов отсутствует. Для доказательства гипоталамических механизмов действия МА-[D-Leu4]-ОВЗ нами было исследовано влияние антагониста GnRH-рецептора цетрореликса (ЦЕТ) на стероидогенные эффекты МА-[D-Leu4]-ОВЗ. При этом ЦЕТ вводили в течение трех дней как отдельно, так и совместно с МА-[D-Leu4]-ОВЗ и ХГЧ. Обработка ЦЕТ ожидаемо снижала уровень тестостерона в крови, который через 3 и 4.5 ч после введения препарата составлял 36 и 25% от его базовых значений (табл. 1). В условиях обработки животных интраназально вводимым МА-[D-Leu4]-ОВЗ ингибирующие эффекты ЦЕТ сохранялись, на что указывало снижение уровня тестостерона до 48% и 32% от его базовых значений через 3 и 4.5 ч после введения препаратов. На третий день эксперимента уровень тестостерона в группах «ЦЕТ+ХГЧ» и «ЦЕТ+ОВЗ +ХГЧ» был снижен через 1.5 ч и нормализовался через 3 ч после введения ХГЧ (4.5 ч после введения ЦЕТ и МА-[D-Leu4]-ОВЗ, соответственно) (табл. 1). Введение МА-[D-Leu4]-ОВЗ не приводило к ослаблению ингибирующего эффекта ЦЕТ на стероидогенез и существенно не влияло на стероидогенный эффект ХГЧ. Таким образом, было показано, что введение самцам крыс ЦЕТ приводит к подавлению способности МА-[D-Leu4]-ОВЗ усиливать эффекты ХГЧ на уровень тестостерона в крови крыс.

Введение ЦЕТ также влияло и на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию синтеза тестостерона. Экспрессия гена *Star* была снижена в группах «ЦЕТ» и «ЦЕТ+ОВЗ» до 62 и 65% от соответствующих значений в контрольной группе (табл. 2). Однократная инъекция ХГЧ

восстанавливала экспрессию *Star*, сниженную в условиях обработки ЦЕТ. Трехдневная обработка МА-[D-Leu4]-ОВЗ не оказывала значимого влияния на эффекты ЦЕТ и ХГЧ на экспрессию гена *Star*. При этом мы наблюдали компенсаторное повышение экспрессии гена *Lhr* в семенниках крыс в группах «ЦЕТ», «ЦЕТ+ОВЗ» и «ЦЕТ+ХГЧ» на 138, 83 и 183%, соответственно, что может быть связано с необходимостью повысить плотность рецепторов ЛГ на плазматической мембране клеток Лейдига в условиях дефицита ЛГ, вызванного введением ЦЕТ. При этом в группе «ЦЕТ+ОВЗ+ХГЧ» экспрессия *Lhr* была на 64% снижена относительно группы «ЦЕТ+ХГЧ».

Таким образом, нами впервые показано, что МА-[D-Leu4]-ОВЗ при интраназальном трехдневном введении усиливает эффекты ХГЧ, агониста рецептора ЛГ, на уровень тестостерона, хотя стимулирующие эффекты гонадотропина на экспрессию генов *Star* и *Lhr*, играющих ключевую роль в регуляции тестикулярного стероидогенеза, в присутствии МА-[D-Leu4]-ОВЗ не меняются. Подавление стимулирующих эффектов GnRH на секреторную активность гонадотрофов гипофиза с помощью ЦЕТ, антагониста GnRH-рецепторов, приводило к снижению уровня тестостерона в крови, а также к снижению экспрессии гена *Star* и компенсаторному повышению экспрессии гена *Lhr* в семенниках крыс. В условиях подавления ГГТ оси с помощью ЦЕТ, введение МА-[D-Leu4]-ОВЗ не оказывало существенного влияния на стероидогенные эффекты ХГЧ, и это может свидетельствовать в пользу того, что мишенью действия МА-[D-Leu4]-ОВЗ являются гипоталамические нейроны.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-75-00130).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Nieuwenhuis D., Pujol-Gualdo N., Arnoldussen I.A.C., Kiliaan A.J.* // *Obes Rev.* 2020. 6: e13005.
2. *Leisegang K., Sengupta P., Agarwal A., Henkel R.* // *Andrologia.* 2021. 53(1): e13617.
3. *Novakovic Z.M., Leinung M.C., Lee D.W., Grasso P.* // *Regul. Pept.* 2009. 154(1-3): 107-11.
4. *Novakovic Z.M., Leinung M.C., Grasso P.* // *Peptides.* 2013. 43: 167-73.
5. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(1): 198.
6. *Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Morina I.Y. et al.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022. 172(4): 435-40.
7. *Zirkin B.R., Papadopoulos V.* // *Biol. Reprod.* 2018. 99(1): 101-11.

БЕНЗИМИДАЗОЛ-КАРБОКСАМИДЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ  
СРЕДСТВА ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА:  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ХОЛИНЭСТЕРАЗАМИ И  
СЕРТОНИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПО ДАННЫМ  
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Белинская Д.А.<sup>1</sup>, Челуснова Ю.В.<sup>2</sup>, Воронина П.А.<sup>1</sup>, Гончаров Н.В.<sup>1</sup>

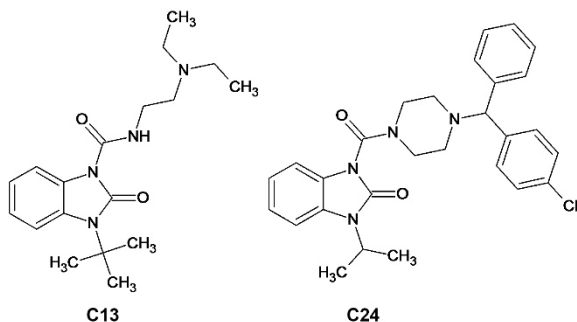
<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,  
Ленинградская обл., Россия

**Введение.** Болезнь Альцгеймера (БА) в значительной степени обусловлена хроническим дефицитом холинергической активности базального отдела переднего мозга. Этот дефицит в существенной мере определяется повышением активности холинэстераз (ХЭ) (ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ)), что приводит к постепенному прекращению холинергической нейротрансмиссии, и, как следствие, к ухудшению памяти и когнитивных функций [1]. Ингибиторы ХЭ донепезил, ривастигмин, галантамин и NMDA-антагонист мемантин, клинически одобренные для терапии БА, могут улучшать когнитивные и поведенческие параметры, однако их эффективность остается неудовлетворительной [2]. Поиск эффективных и безопасных средств для лечения БА является актуальной задачей. Одна из разрабатываемых стратегий лечения – создание препаратов, которые могут действовать на несколько мишеней, связанных с патогенезом болезни. Для терапии БА представляются многообещающими гибридные молекулы, сочетающие в себе антихолинэстеразную активность и высокую аффинность к серотониновым рецепторам (5-НТ<sub>6</sub> 5-НТ<sub>6</sub> (способствуют высвобождению ацетилхолина) [3] и 5-НТ<sub>4</sub> (их стимуляция замедляет образование внеклеточных амилоидных бляшек) [4]. Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что рецепторы 5-НТ<sub>7</sub> также могут быть подходящей терапевтической мишенью для терапии нейродегенеративных расстройств [5]. В нашей недавней работе [6] в эксперименте *in vitro* мы исследовали антихолинэстеразную активность замещенных 1,3-дигидро-2-оксо-1*H*-бензимидазол-2-онов и определили два наиболее перспективных соединения: соединение 13 (С13) и соединение 24 (С24) (рис. 1), обладающие максимальной ингибиторной активностью по отношению к БХЭ и АХЭ, соответственно (табл. 1). Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования изучить взаимодействие С13 и С24 с ХЭ и серотониновыми рецепторами 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>, описать



сайты связывания, оценить эффективность взаимодействия и перспективность поиска средств терапии БА среди соединений из группы бензимидазол-карбоксамидов.



**Рис. 1.** Структуры исследуемых бензимидазол-карбоксамидов.

**Табл. 1.** Антихолинэстеразная активность бензимидазол-карбоксамидов по данным *in vitro* [6].

ингибитор	АХЭ	БХЭ
	$K_i$ , мкМ / тип ингибирования	$K_i$ , мкМ /тип ингибирования
C13	36.07 / конкурентный	1.681 / неконкурентный
C24	0.133 / неконкурентный	нет ингибирования

**Методы.** Расчет констант кислотности показал, что при физиологических значениях pH молекулы C13 и C24 протонированы и положительно заряжены. Трехмерные модели протонированных форм препаратов были построены и оптимизированы методом минимизации энергии с использованием программы HyperChem 8.0 [7]. Для расчетных экспериментов были использованы трехмерные структуры ХЭ и 5-HTR человека из базы данных белковых структур PDB. Поиск сайтов связывания препаратов проводили методом «слепого» докинга (областью поиска задается вся поверхность белка) с помощью онлайн сервиса SwissDock [8]. Молекулярный докинг C24 и C13 в найденные сайты связывания ХЭ и 5-HTR проводили с помощью программы Autodock Vina 1.1.2 [9]. В исследуемом сайте задавали область поиска размером  $25 \times 25 \times 25 \text{ \AA}^3$ . Число запусков (exhaustiveness) принимали равным 10. Количество наиболее оптимальных (энергетически выгодных) конформаций в выходном файле (num\_modes) задавали равным 10. Для анализа отбирали самую энергетически выгодную конформацию.

**Результаты.** Согласно данным слепого докинга, на поверхности АХЭ существует три возможных сайта связывания бензимидазол-карбоксамидов (сайты S1a, S2a и S3a), а на поверхности БХЭ – два сайта

(S1b и S2b). Сайты S1a и S1b представляют собой полость в глобуле АХЭ и БХЭ, соответственно, соединяющую активный центр фермента и периферический анионный сайт (ПАС) на его поверхности. Таким образом, сайты S1a и S1b являются сайтами связывания конкурентных ингибиторов ХЭ. Сайты S2a и S3a, а также сайт S2b представляют собой карманы на поверхности АХЭ и БХЭ, которые топологически не совпадают с активным центром этих ферментов и, следовательно, являются сайтами связывания неконкурентных ингибиторов (аллостерических модуляторов) ХЭ. Найденные нами аллостерические сайты на поверхности АХЭ и БХЭ уже были описаны в литературе [10-12].

Результат молекулярного докинга C13 и C24 в найденные сайты представлен в табл. 2.

**Табл. 2.** Значения свободных энергий связывания  $\Delta G$  бензимидазолкарбоксамидов и с сайтами АХЭ и БХЭ по данным молекулярного докинга.

	$\Delta G$ , ккал/моль				
	АХЭ			БХЭ	
	S1a	S2a	S3a	S1b	S2b
C13	-7.5	-6.7	-5.7	-6.8	-6.6
C24	НВ	-7.9	-7.4	-0.3	НВ

НВ – нет взаимодействия (значение  $\Delta G > 0$ ).

Согласно расчётным значениям свободной энергии связывания (табл. 2), S1a является основным сайтом взаимодействия C13 с АХЭ, что согласуется с нашими экспериментальными данными, указывающими на то, что C13 является конкурентным ингибитором АХЭ (табл. 1). В случае БХЭ, C13 с примерно равной эффективностью связывается с сайтом конкурентных ингибиторов S1b и с аллостерическим сайтом S2b. По данным докинга, C24 не взаимодействует с сайтом S1a (по всей видимости, из-за стерических ограничений), но эффективно связывается с аллостерическими сайтами S2a и S3a, что соответствует результату биохимического эксперимента. При этом S2a, согласно полученным данным, является основным сайтом взаимодействия C24 с АХЭ. C24 практически с нулевой эффективностью связывается с сайтом S1b БХЭ и не взаимодействует с сайтом S2b, что опять же согласуется с данными *in vitro* об отсутствии ингибирующего эффекта C24 на активность БХЭ (табл. 1). Единственная несогласованность данных *in silico* и *in vitro* заключается в том, что по данным молекулярного моделирования C13 существенно эффективнее взаимодействует с сайтами S1a и S1b, чем в биохимическом эксперименте. Так, согласно значениям констант, приведенным в табл. 1, C13 почти в 300 раз менее эффективно ингибирует АХЭ по сравнению с C24 (значения  $K_i$  составляют 36.07 и 0.133 мкМ, соответственно), тогда как расчетные значения  $\Delta G$  различаются всего

лишь на 0.4 ккал/моль (–7.5 ккал/моль для С13 в сайте S1a и –7.9 ккал/моль для С24 в сайте S2a). С13 является строго неконкурентным ингибитором БХЭ, однако, согласно результату докинга, С13 с примерно равной эффективностью взаимодействует и с обоими сайтами. Этот эффект «завышения» эффективности можно объяснить тем, что взаимодействие с полостью сайтов S1a и S1b, расположенных глубоко в глобуле ХЭ, происходит поэтапно. На первом этапе лиганд заякоривается в ПАС, после чего постепенно продвигается вглубь активного центра фермента. По всей видимости, этот дополнительный этап связывания, который сложно учесть при докинге лиганда внутри активного центра, в реальных условиях снижает эффективность взаимодействия С13 с сайтами S1a и S1b.

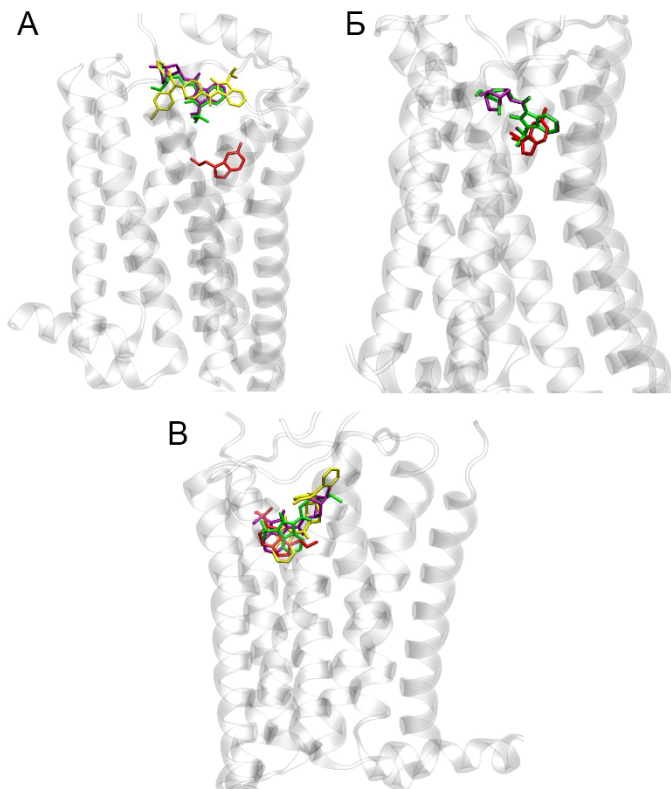
На заключительном этапе мы провели первичную оценку эффективности взаимодействия С13, С24 и В1МУ-8 (селективного агониста 5-НТ<sub>4</sub>) с серотониновыми рецепторами 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>. (табл. 3). Согласно данным молекулярного докинга, С13, С24 и В1МУ-8 могут связываться с 5-НТ<sub>4</sub> в той же полости рецептора, что и молекула серотонина (рис. 2А). Однако из-за больших стерических размеров эти препараты связываются не на дне этого сайта (как серотонин), а ближе к его входу. С13 и В1МУ-8 взаимодействуют с 5-НТ<sub>6</sub> в том же положении, что и серотонин, на дне кармана между трансмембранными спиралью рецептора (рис. 2Б). С24 не взаимодействует с 5-НТ<sub>6</sub>. И наконец, в случае 5-НТ<sub>7</sub>, все три препарата также связываются с рецептором в той же позиции, что и аналог серотонина 3-(2-азанилэтил)-1Н-индол-5-карбоксамид (рис. 2В).

**Табл. 3.** Значения свободных энергий связывания  $\Delta G$  бензимидазолкарбоксамидов с серотониновыми рецепторами по данным молекулярного докинга.

	$\Delta G$ , ккал/моль		
	5-НТ <sub>4</sub>	5-НТ <sub>6</sub>	5-НТ <sub>7</sub>
С13	–8.1	–5.5	–7.9
С24	–10.7	НВ	–8.9
В1МУ-8	–9.0	–4.6	–8.4

НВ – нет взаимодействия (значение  $\Delta G > 0$ ).

Согласно полученным расчетным данным, бензимидазолкарбоксамиды прочнее всего связываются с рецептором 5-НТ<sub>4</sub>. Экспериментальные данные об эффективности взаимодействия С13 и С24 с 5-НТ еще не получены, однако эти препараты являются производными соединения В1МУ-8, следовательно, можно ожидать, что самое эффективное связывание будет именно с этим типом 5-НТ<sub>4</sub>. Также С13 и С24 с высокой эффективностью взаимодействуют с 5-НТ<sub>7</sub>, но не с 5-НТ<sub>6</sub>.



**Рис. 2.** Положение молекул C13 (зеленым), C24 (желтым) и VIMU-8 (пурпурным) в сайте связывания рецепторов 5-HT<sub>4</sub> (А), 5-HT<sub>6</sub> (Б) и 5-HT<sub>7</sub> (В) по данным молекулярного докинга. Красным цветом показано положение молекул агонистов серотониновых рецепторов по данным криоэлектронной микроскопии [13].

Таким образом, полученные нами экспериментальные и расчетные данные позволяют утверждать, что препараты из класса бензимидазол-карбоксамидов являются перспективными средствами терапии болезни Альцгеймера, действуя одновременно на несколько молекулярных мишеней, задействованных в патогенезе БА.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Soria-Lopez J.A., González H.M., Léger G.C.* // *Handb Clin Neurol.* 2019. 167: 231-55.
2. *García-Morales V., González-Acedo A., Melguizo-Rodríguez L. et al.* // *Biomedicines.* 2021. 9: 1910.
3. *Szalai N., Godyń J., Jończyk J. et al.* // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2020. 35: 1944-52.
4. *Rochais C., Lecoutey C., Gaven F.* // *J. Med. Chem.* 2015. 58: 3172-87.
5. *Quintero-Villegas A., Valdés-Ferrer S.I.* // *Mol. Med.* 2022. 28(1): 70.
6. *Челуснова Ю.В., Воронина П.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В.* // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2023. 175(3): 326-34.
7. *Froimowitz M.* // *Biotechniques.* 1993. 14: 1010-3.
8. *Grosdidier A., Zoete V., Michielin O.* // *Nucleic Acids Res.* 2011. 39: W270-7.
9. *Trott O., Olson A.J.* // *J. Comput. Chem.* 2010. 31(2): 455-61.
10. *Roca C., Requena C., Sebastián-Pérez V.* // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018. 33(1): 1034-47.
11. *Yu P., Chen Z., Liu Y. et al.* // *Molecules.* 2022. 27(6): 2013.
12. *Selvakumar R., Geib S.J., Sankar A.M. et al.* // *J. Phys. Chem. Solids.* 2015. 86: 49-56.
13. *Huang S., Xu P., Shen D.D. et al.* // *Mol. Cell.* 2022. 82(14): 2681-95.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С РЕЦЕПТОРОМ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА БЕТА ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

*Белинская Д.А.<sup>1</sup>, Гончаров Н.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека»  
ФМБА России, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

**Введение.** Трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ ) – цитокин, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток, участвует в иммунном ответе и патогенезе многих заболеваний [1]. Рецептор TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R) локализован в плазматической мембране разного типа клеток и представляет собой димер (TGF $\beta$ R1-II), образованный мономером TGF $\beta$ R типа I (TGF $\beta$ R1) и TGF $\beta$ R типа II (TGF $\beta$ R2). После связывания TGF $\beta$  с TGF $\beta$ R2 происходит димеризация. Полный рецептор аутофосфорилируется и запускает сигнальный каскад через белки Smad [2].

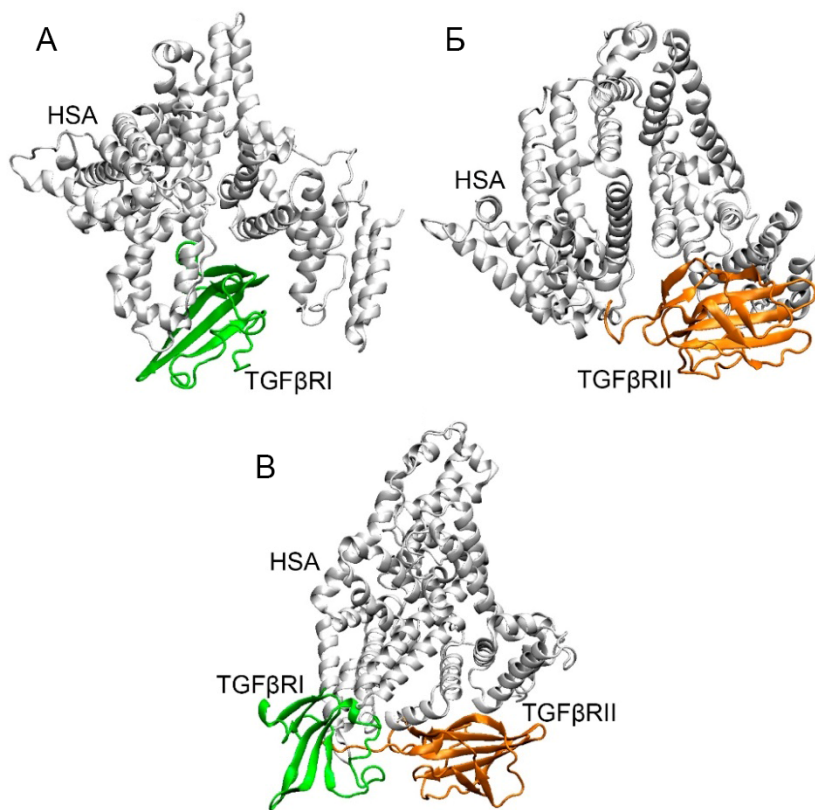
Накапливаются данные о важной роли альбумина в эпилептогенезе посредством его взаимодействия с  $TGF\beta R$  [3]. При нарушении целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в результате травмы, интоксикации, ишемии или инфекции, экстравазированный альбумин поглощается астроцитами через  $TGF\beta R$  и ведет к Smad2-опосредованному подавлению калиевого канала  $Kir4.1$ , что приводит к накоплению внеклеточного калия, облегчению NMDA-опосредованной повышенной возбудимости и, в конечном итоге, проявлению эпилептиформной активности. Патогенез перечисленных выше заболеваний, приводящих к нарушению ГЭБ, характеризуется повышенным содержанием в плазме модифицированного (окисленного, гликированного) альбумина. Остается неисследованным вопрос об отличиях в аффинности немодифицированного и модифицированного альбумина к цитокиновым рецепторам паренхимы мозга. Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования изучить взаимодействие нативного и модифицированного (окисленного и гликированного) свороточного альбумина человека (HSA) с  $TGF\beta R$ .

**Методы.** Поскольку в литературе не представлены данные о механизме взаимодействия альбумина с  $TGF\beta R$ , мы изучили взаимодействие HSA как с мономерами  $TGF\beta RI$  и  $TGF\beta RII$ , так и с димером  $TGF\beta RI-II$ . В качестве трехмерных моделей HSA и внеклеточных доменов димера  $TGF\beta R$  использовали структуры белков, полученные методом рентгеноструктурного анализа (PCA), из базы данных PDB, коды структур 2bxd [4] и 2rju [5], соответственно. С помощью онлайн-сервиса ClusPro [6] был проведен молекулярный докинг HSA на поверхность внеклеточных доменов  $TGF\beta RI$ ,  $TGF\beta RII$  и димера  $TGF\beta RI-II$ . В качестве лиганда задавали альбумин, в качестве рецептора – мономеры и димер  $TGF\beta R$ . Для дальнейшей симуляции конформационных изменений отбирали самые энергетически выгодные конформации комплексов HSA- $TGF\beta R$ , но такие, в которых альбумин не пересекался бы с плазматической мембраной.

Конформационные изменения полученных комплексов были рассчитаны методом молекулярной динамики в водном растворе. Использовали программный пакет Gromacs 2019.4 [7], силовое поле CHARMM27 [8]. Длина всех симуляций составила 100 нс с шагом интегрирования 0.002 пс. Прочность комплексов HSA- $TGF\beta R$  оценивали по количеству атомов, образующих близкие контакты между белками (в расчет принимали те атомы HSA, которые в комплексах HSA- $TGF\beta R$  находятся менее, чем в 3 Å от поверхности  $TGF\beta R$ , и наоборот).

**Результаты.** Результаты моделирования взаимодействия HSA с  $TGF\beta R$  представлены на рис. 1. Согласно полученным данным, HSA

может взаимодействовать как с мономерами, так и с димером  $TGF\beta R$ . Известно, что третичная структура альбумина представляет собой три гомологичных домена, DI, DII и DIII, каждый из этих доменов состоит из двух субдоменов. Интересно отметить, что мономер  $TGF\beta RI$  взаимодействует преимущественно с доменом DI альбумина, мономер  $TGF\beta RII$  – с доменом DIII, а в комплексе альбумина с димером оба мономера взаимодействуют с обоими доменами DI и DIII «крест-накрест».



**Рис. 1.** Взаимодействие рецептора трансформирующего фактора роста бета ( $TGF\beta R$ ) с альбумином человека (HSA) по данным молекулярного моделирования. А – комплекс HSA с мономером  $TGF\beta RI$ ; Б – комплекс HSA с мономером  $TGF\beta RII$ ; В – комплекс HSA с димером  $TGF\beta RI-II$ . Белым цветом отмечен HSA, зеленым – мономер  $TGF\beta RI$ , оранжевым – мономер  $TGF\beta RII$ .

Прочность связи можно оценить по количеству контактов между аминокислотами TGFβR и альбумина. В табл. 1 приведено число атомов, образующих близкие контакты между нативным альбумином и рецептором в изученных комплексах. Ожидаемо, наибольшее количество контактов у комплекса альбумина с димером TGFβRI-II, при этом в составе этого димера контактов с мономером TGFβRII больше по сравнению с TGFβRI. Что касается взаимодействия альбумина с мономерами по отдельности, то с TGFβRI нативный HSA взаимодействует эффективнее по сравнению с TGFβRII. Более того, при наложении комплексов HSA-TGFβRI и HSA-TGFβRII на комплекс TGFβRI-II, полученный методом PCA (рис. 1A), можно увидеть, что в комплексе HSA-TGFβRII альбумин «закрывает» сайт взаимодействия TGFβRII с TGFβRI, то есть димеризация невозможна. Тогда как после образования комплекса HSA-TGFβRI возможна дальнейшая стыковка с TGFβRII и образование димера.

**Табл. 1.** Количество атомов, образующих контакты в комплексах нативного и модифицированного альбумина человека (HSA) с мономерами и димером рецептора трансформирующего фактора роста бета (TGFβR).

HSA-TGFβRI		HSA-TGFβRII		HSA-TGFβRI-II		
HSA	TGFβRI	HSA	TGFβRII	HSA	TGFβRI	TGFβRII
Нативный альбумин						
47	64	34	35	115	39	70
Окисленный альбумин						
n/d	n/d	n/d	n/d	95	28	72
Гликированный альбумин						
39	44	40	44	67	32	50

HSA-TGFβRI, HSA-TGFβRII, HSA-TGFβRI-II – комплексы альбумина с мономером TGFβRI, мономером TGFβRII и димером TGFβRI-II, соответственно; n/d – расчеты не проводились.

Поскольку димеризация TGFβR возможна только после связывания TGFβ с TGFβRII, а аффинность TGFβRII к «родному» субстрату TGFβ априори выше, чем к альбумину, мы полагаем, что возможны следующие механизмы взаимодействия нативного альбумина с TGFβR:

- (1) альбумин взаимодействует с TGFβRI (конформация, найденная нами методом молекулярного моделирования, рис. 1A), димер не образуется;
- (2) альбумин взаимодействует с TGFβRI (рис. 1A), после чего образуется димер, и комплекс переходит в конформацию, также найденную нами методом молекулярного моделирования (рис. 1B)
- (3) альбумин взаимодействует с TGFβRII (рис. 1B), димер не образуется.



Согласно данным *in silico*, для нативного альбумина вариант (2) наиболее вероятен, поскольку взаимодействие нативного HSA с TGFβRI эффективнее по сравнению с TGFβRII, а комплекс HSA с димером еще более прочный по сравнению с мономером TGFβRI.

На следующем шаге мы изучили эффективность взаимодействия окисленного HSA с TGFβR. В молекуле альбумина есть свободная тиоловая группа в составе цистеина Cys34, которая может взаимодействовать с другими тиолами или окисляться до сульфеновой и сульфиноной кислоты. Анализ комплексов альбумина с TGFβR, описанных выше (рис. 1), выявил, что только в комплексе HSA с димером TGFβRI-II Cys34 находится достаточно близко к поверхности рецептора для того, чтобы окисление цистеина Cys34 могло повлиять на прочность комплекса. Для того, чтобы оценить влияние окисления альбумина на его взаимодействие с TGFβR, методом молекулярной динамики мы изучили конформационные изменения комплекса димера TGFβRI-II с HSA, в котором Cys34 окислен до сульфиноной кислоты (HSA-Cys34-SOO<sup>-</sup> или oxHSA). В табл. 1 приведено количество атомов, образующих близкие контакты между oxHSA и TGFβRI-II. Согласно полученным данным, после окисления Cys34, ослабляется взаимодействие HSA с мономером TGFβRI в димере, тогда как прочность взаимодействия с мономером TGFβRII не изменяется, даже немного усиливается за счет того, что в этом комплексе появляются два дополнительных контакта из-за взаимодействия водородов Arg34 TGFβRII с одним из кислородов группы SOO<sup>-</sup> окисленного Cys34 альбумина.

На заключительном этапе было изучено взаимодействие гликированного альбумина с TGFβR. Отличие альбумина от других белков крови состоит в том, что в норме он не гликирован, хотя даже небольшой процент гликированного альбумина вносит существенный вклад в патогенез многих заболеваний. Наиболее изучено гликирование по остаткам лизина. Согласно описанным выше данным по взаимодействию нативного HSA с TGFβR, на протяжении симуляции молекулярной динамики следующие лизины альбумина находятся в близком контакте с рецептором: Lys432, Lys436, Lys439 и Lys519 в комплексе с мономером TGFβRI; Lys500 и Lys538 в комплексе с мономером TGFβRII; Lys41, Lys519, Lys525 и Lys560 в комплексе с димером TGFβRI-II. В условиях *in vivo* все эти лизины, кроме Lys41, могут быть гликированы [9]. Для того чтобы оценить влияние гликирования альбумина на его взаимодействие с TGFβR, методом молекулярной динамики мы изучили конформационные изменения комплексов HSA с мономерами и димером TGFβR, в которых соответствующие лизины были гликированы до конечных продуктов гликирования. Модель гликированных лизинов была взята из работы [10].

В табл. 1 приведено количество атомов, образующих близкие контакты в комплексе TGF $\beta$ R с гликированным HSA (gHSA). Согласно полученным данным, гликирование альбумина ослабляет взаимодействие белка с мономером TGF $\beta$ RI и димером TGF $\beta$ RI-II, но усиливает связывание альбумина с мономером TGF $\beta$ RII. Таким образом, гликирование HSA однозначно уменьшает вероятность образования димера: во-первых, ослабляется прочность самого димера, во-вторых, усиливается связывание альбумина с мономером TGF $\beta$ RII, причем в той конформации, в которой образование димера невозможно (на поверхности TGF $\beta$ RII альбумин перекрывает сайт взаимодействия с TGF $\beta$ RI). Что касается окисления, то однозначного ответа на данном этапе дать нельзя. После окисления альбумина в комплексе с димером ослабляется связь с мономером TGF $\beta$ RI, но при этом несколько усиливается связь с мономером TGF $\beta$ RII. Следует отметить, что в комплексе TGF $\beta$  с димером TGF $\beta$ RI-II (рис. 1A) TGF $\beta$  взаимодействует с только с мономером TGF $\beta$ RII, при этом образование такого комплекса запускает сигнальный каскад Smad. Поэтому можно выдвинуть предположение, что окисление альбумина может способствовать переходу комплекса HSA-TGF $\beta$ RI-II в такую конформацию, которая запускает конформационные изменения во внутриклеточном домене TGF $\beta$ R, приводящие к запуску сигнального каскада.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке проекта РНФ № 22-15-00155.

**Благодарности.** Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (<https://scc.spbstu.ru/>).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kubiczikova L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S.J. // *Transl. Med.* 2012. 10: 183.
2. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules.* 2020. 10(3): 487.
3. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Shmurak V.I. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(19): 10318.
4. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I. et al. // *J. Mol. Biol.* 2005. 353(1): 38-52.
5. Groppe J., Hinck C.S., Samavarchi-Tehrani P. et al. // *Mol. Cell.* 2008. 29(2): 157-68.
6. Desta I.T., Porter K.A., Xia B. et al. // *Structure.* 2020. 28(9): 1071-81.e3.
7. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. // *SoftwareX.* 2015. 1-2: 19-25.
8. Bjelkmar P., Larsson P., Cuendet M.A. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2010. 6(2): 459-66.
9. Qiu H.Y., Hou N.N., Shi J.F. et al. // *World J. Diabetes.* 2021. 12(7): 1057-69.
10. Sartore G., Bassani D., Ragazzi E. et al. // *Sci Rep.* 2021. 11(1): 22860.

# ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ И ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АЛЬФА-АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЕЙСМЕКЕРНОЙ ФУНКЦИИ СИНОАТРИАЛЬНОГО УЗЛА

*Воронина Я.А.<sup>1,2</sup>, Кузьмин В.С.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория электрофизиологии сердца института экспериментальной кардиологии НМИЦ Кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, Москва, Россия

**Введение.** Нарушение ритма сердца является одной из наиболее распространенных патологий сердечно-сосудистой системы. Существует значительное количество типов аритмий, связанных с изменением возбудимости и проводимости различных отделов сердца. Причиной возникновения таких нарушений может быть целый спектр факторов, например, дисбаланс автономной нервной регуляции. Избыточная активность симпатического отдела вегетативной нервной системы, проявляющаяся в повышенном высвобождении норадреналина в сердце, а также в чрезмерной стимуляции адренорецепторов (АР) кардиомиоцитов, приводит к формированию аритмий, связанных с нарушением проведения возбуждения в атриовентрикулярном узле (АВУ) и предсердиях. Считается, что основным медиатором симпатотонических аритмий являются адренорецепторы  $\beta$ -подтипа. Однако установлено, что в миокарде в значительном количестве присутствуют не только  $\beta$ -адренорецепторы, но и адренорецепторы  $\alpha_1$ -типа ( $\alpha_1$ -АР) [1].

Ранее показано, что активация  $\alpha_1$ -АР приводит к увеличению длительности атриовентрикулярной задержки, увеличению длительности эффективного рефрактерного периода в АВУ; установлено, что при активации  $\alpha_1$ -АР возникают блоки проведения в АВУ. Таким образом, эффекты активации  $\alpha_1$ -АР в АВУ сводятся к подавлению его активности и могут служить причиной АВ-узловых брадиаритмий. Известно, что в гладкомышечных клетках (ГМК) активация  $\alpha_1$ -АР приводит к изменению мембранного потенциала и повышению тонуса. Несмотря на существенные различия, некоторые механизмы, опосредующие эффекты активации  $\alpha_1$ -АР в ГМК и кардиомиоцитах, могут быть одинаковыми. Активация мембранных  $\alpha_1$ -АР посредством сигнального каскада  $G_q/PLC/IP_3$  приводит к высвобождению  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулаума. В свою очередь, повышение  $[Ca^{2+}]_i$  может являться необходимым элементом для активации протеинкиназы С (PKC) или сигналом, регулирующим свойства ионных каналов и обменников [2]. Установлено, что стимуляция  $\alpha_1$ -АР опосредует повышение тонуса ГМК за счет увеличения хлорной проводимости ( $g_{Cl}$ ) [3-4]. Значительное количество хлорных каналов экспрессируется и в кардиомиоцитах [5]. К настоящему времени показано, что  $\alpha_1$ -АР могут регулировать  $g_{Cl}$  в

кардиомиоцитах, модулируя проводимость хлорных каналов CFTR [6]. Повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , сопровождающее стимуляцию  $\alpha_1$ -АР, может приводить к активации кальций-зависимых хлорных каналов (CaCC) кардиомиоцитов [7]. Изменение хлорной проводимости и хлорные каналы могут являться мишенями, которые опосредуют  $\alpha$ -адренергические эффекты в сердце. Тем не менее, электрофизиологические эффекты и внутриклеточные механизмы передачи сигналов при активации  $\alpha_1$ -АР в суправентрикулярном миокарде и ритмоводителе сердца – синоатриальном узле (САУ) – остаются не изученными. Не установлена роль  $\alpha_1$ -АР в формировании синусноузловых аритмий. Целью данной работы является исследование физиологической роли, эффектов и внутриклеточных механизмов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ в сопоставлении с атриовентрикулярным узлом.

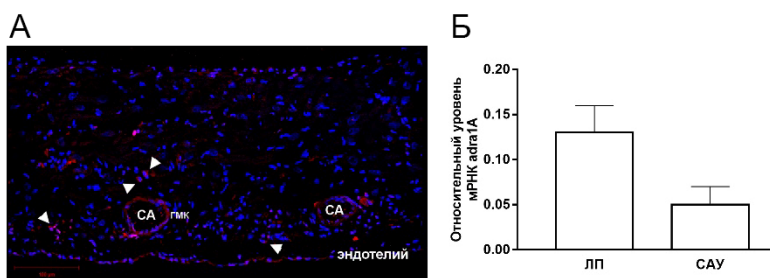
**Материалы и методы.** В экспериментах использовали половозрелых самцов крыс стока Wistar (250-300 г, возраст 10 недель). Наличие  $\alpha_{1A}$ -АР в синоатриальном узле определяли с помощью метода иммунофлюоресцентного анализа экспрессии белков, а также метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). При иммунофлюоресцентном анализе экспрессии белков изолировали тканевые препараты области САУ (миокард, окружающий артерии САУ) крыс (n = 3). Для РВ-ПЦР использовали препараты левого предсердия и САУ (образцы с радиусом 4 мм от места бифуркации артерии САУ).

Функциональную оценку работы САУ проводили с использованием метода ретроградной перфузии изолированного по Лангендорфу сердца (n = 23) с регистрацией предсердной электрограммы (ЭГ). В данных экспериментах осуществляли электрическую стимуляцию предсердий в течение 30 секунд длительностью межстимуляторных интервалов 75-270 мс; затем стимуляцию прекращали и в течение 1 минуты регистрировали предсердную ЭГ. В данных экспериментах оценивали частоту спонтанного возбуждения в САУ, а также время восстановления функции синусного узла (ВВФСУ). ВВФСУ определяется как длительность интервала от последнего стимула до восстановления автоматизма САУ. Разницу между ВВФСУ и средним значением ритма сердца крысы определяли как скорректированное значение ВВФСУ (кВВФСУ). Запись и обработку эксперимента производили в программе «Power Graph 3.3».

Для выявления изменения проведения возбуждения в тканевых препаратах правого предсердия, включающих область САУ, использовали метод оптического картирования электрической активности миокарда с помощью потенциалчувствительного зонда di-4-ANEPPS (n = 11). Система оптического картирования электрической активности миокардиальной ткани включала фотодиодную матрицу CardioPDA-III (RedShirtImaging, Decatur, GA, USA) в комплекте с программным обеспечением (Cardioplex v.8.2.1).

В качестве агониста  $\alpha_1$ -АР использовали фенилэфрин (ФЭ), в качестве блокатора РКС – бис(индол-3-ил)малеимид (ВИМ), в качестве блокатора кальций-зависимых хлорных каналов – 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойную кислоту (NPPB) в концентрациях 10 и/или 100 мкМ. Статистически значимые различия выявляли при помощи программы статистической обработки данных «GraphPad Prism 7». В каждой из экспериментальных групп использовали соответствующий метод статистической обработки. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее  $\pm$  ст. откл.

**Результаты.** С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии установлено, что в САУ наблюдается экспрессия  $\alpha_{1A}$ -АР, причем этот подтип рецепторов локализуется как в околядерной зоне, так и в области мембран кардиомиоцитов (рис. 1А). При оценке экспрессии  $\alpha_{1A}$ -АР методом РВ-ПЦР установлено, что данный подтип рецепторов обнаруживается как в рабочем миокарде левого предсердия, так и в препаратах САУ (рис. 1Б).



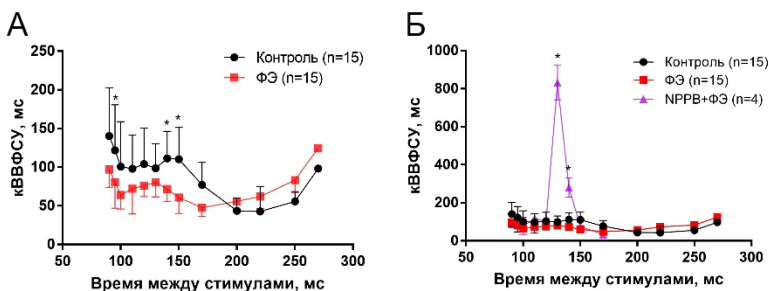
**Рис. 1.** А. Специфическая флуоресценция, отражающая распределение  $\alpha_{1A}$ -АР на периферии артерии САУ. Флуоресценция  $\alpha_{1A}$ -АР показана красным псевдоцветом. Ядра окрашены DAPI (синий псевдоцвет). ГМК – гладкомышечные клетки, СА – артерия синусового узла. Б. Относительный уровень экспрессии  $\alpha_{1A}$ -АР в рабочем миокарде левого предсердия (ЛП) и миокарде САУ.

В функциональных экспериментах показано, что ФЭ статистически значимо увеличивает синусовый ритм перфузируемого по Лангендорфу сердца ( $5.19 \pm 0.85$  Гц,  $n = 15$ ; в контроле –  $4.25 \pm 0.52$  Гц,  $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) и не приводит к подавлению возбуждения в САУ. В диапазоне коротких межстимуляционных интервалов (т.е. при высокой частоте стимуляции) ФЭ вызывает значительное уменьшение ВВФСУ: на фоне ФЭ при межстимуляционном интервале в 9 мс –  $3.23 \pm 0.29$  мс/мс ( $n = 15$ ), в контроле –  $4.33 \pm 0.8$  мс/мс ( $n = 15$ ).

Корригированное значение ВВФСУ сложным образом зависит от частоты стимуляции САУ. В частности, у крыс при межстимуляционном

интервале 150 мс, что соответствует верхней границе ЧСС у крыс *in vivo*, наблюдается пик кВВФСУ ( $110.3 \pm 40$  мс,  $n = 15$ ), то есть способность САУ к автоматии и возбуждению предсердного миокарда оказывается снижена. ФЭ значительно уменьшает ( $60.8 \pm 21$  мс,  $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) кВВФСУ при длительности интервалов между стимулами 110-150 мс, т.е. при высокой ЧСС (рис. 2А).

В следующей серии экспериментов производили оценку вклада внутриклеточных и ионных механизмов в эффекты активации  $\alpha_1$ -АР в САУ. Блокатор РКС ВІМ (10 мкМ) имел тенденцию отменять повышение ритма изолированного сердца, вызываемое ФЭ ( $3.86 \pm 0.2$  Гц,  $n = 5$ ) при спонтанном синусовом ритме. Однако, при оценке кВВФСУ в диапазоне межстимуляторных интервалов от 200 до 90 мс ВІМ не подавляет снижение параметра, вызванное ФЭ. При действии 10 мкМ NPPВ (блокатора СаСС) кВВФСУ значительно увеличивается: при интервалах между стимулами 130 мс –  $823.2 \pm 90.7$  мс ( $n = 3$ ) по сравнению с  $98.7 \pm 31.6$  мс в контроле ( $n = 15$ ) (рис. 2Б).



**Рис. 2.** Эффекты агониста  $\alpha_{1A}$ -АР фенилэфрина в САУ. А. Влияние ФЭ на кВВФСУ, \* –  $p < 0.05$ . Б. Влияние ФЭ на фоне NPPВ на кВВФСУ, \* –  $p < 0.05$ .

При использовании метода оптического картирования установлено, что ФЭ вызывает значительное увеличение площади первичной активации – до  $0.25 \pm 0.01$  мм<sup>2</sup> ( $n = 6$ ) по сравнению с  $0.15 \pm 0.01$  мм<sup>2</sup> в контроле ( $n = 6$ ). Кроме того, ФЭ значительно повышает частоту спонтанных возбуждений: на  $122.3 \pm 12\%$  от контроля ( $p < 0.05$ ). Общей тенденцией при действии ФЭ в пейсмекерной области САУ является смещение зон первичной активации в направлении устья верхней полой вены (величина смещения  $2.4 \pm 0.1$  мм).

Ингибирование РКС (10 мкМ ВІМ) при действии ФЭ не оказывает существенного влияния на паттерн активации САУ, т.е. не приводит к заметной миграции точки первичной активации (ТПА), изменению частоты генерации возбуждения ( $154.4 \pm 14\%$  от контроля) и площади зоны первичной активации. При действии NPPВ происходит значимое

уменьшение зоны первичной активации (до  $0.04 \pm 0.004 \text{ мм}^2$ ), а также миграция зоны первичной активации ( $0.8 \pm 0.1 \text{ мм}$ ). Кроме того, при действии NPPB наблюдается снижение частоты спонтанной активности в тканевых препаратах САУ. В некоторых экспериментах NPPB подавляет активацию центральной части САУ, то есть той зоны, в которой в контрольных условиях располагалась ТПА. Фенилэфрин на фоне NPPB приводит к инициации возбуждения за пределами невозбудимой зоны, что сопровождается уменьшением площади ТПА и снижением ритма спонтанной активности. Формирование невозбудимых зон на фоне NPPB может сопровождаться образованием синусно-узлового re-entry.

**Обсуждение и выводы.** В данной работе впервые показано, что  $\alpha_1$ -АР обнаруживаются в области САУ как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Активация  $\alpha_1$ -АР снижает кВВФСУ (т.е. уменьшает время восстановления спонтанной активности в САУ) и облегчает активацию предсердного миокарда при высокой ЧСС. Физиологическая роль  $\alpha_1$ -АР пейсмекерных кардиомиоцитов может заключаться в поддержании автоматии САУ при высоком ритме сердца. Показано, что эффекты активации  $\alpha_1$ -АР в САУ противоположны эффектам, наблюдаемым в АВУ. Активация  $\alpha_1$ -АР в САУ приводит к облегчению передачи возбуждения в рабочий миокард, а не к подавлению проведения возбуждения, наблюдаемому в АВУ.

При исследовании механизмов наблюдаемых эффектов активации  $\alpha_1$ -АР показано, что ингибирование РКС не оказывает влияния на эффекты ФЭ. Ингибитор РКС не отменяет эффекты активации  $\alpha_1$ -АР ни на кВВФСУ в функциональных экспериментах, ни на паттерн активации миокарда САУ. Таким образом, вовлеченность РКС в  $\alpha$ -адренергическую модуляцию ритма сердца является маловероятной. В противоположность РКС, блокада СаСС и подавление  $g_{Cl}$  вызывает изменение как кВВФСУ, так и паттерна активации САУ. Эти результаты позволяют предположить, что именно СаСС, опосредуют эффекты ФЭ в САУ, вероятно, за счет повышения  $[Ca^{2+}]_i$ .

$\alpha_1$ -АР важны для реализации пейсмекерной функции САУ. Блокада кальций-зависимых хлорных каналов приводит к подавлению эффектов активации  $\alpha_1$ -АР в САУ. Исходя из экспериментов с оценкой паттерна активации при действии NPPB, можно сделать предположение, что СаСС именно периферии САУ облегчают передачу возбуждения из центральной части САУ к рабочему миокарду. Возможно, стабилизирующее (деполяризующее) действие  $g_{Cl}$ , усиленной при действии ФЭ в синусном узле, значимо для его функции при высоком ритме сердца. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 22-15-00189).

## ЛИТЕРАТУРА

1. O'Connell T.D. et al. // Pharmacol. Rev. 2013. 66(1): 308-33.
2. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. // Ann. Endocrinol. (Paris). 2021. 82(3-4): 193-7.
3. Gould D.J., Hill C.E. // Am. J. Physiol. 1996. 271(6Pt2): H2469-76.
4. Lamb F.S., Kooy N.W., Lewis S.J. // Eur. J. Pharmacol. 2000. 401(3): 403-12.
5. Duan D.D. // Compr. Physiol. 2013. 3(2): 667-92.
6. Diena T., Melani R., Caci E. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2007. 560(2-3): 127-31.
7. Burashnikov A., Antzelevitch C. // Cardiovasc. Res. 1999. 43(4): 901-8.

## СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

*Долгачева Л.П.<sup>1</sup>, Челуснова Ю.В.<sup>2</sup>, Белинская Д.А.<sup>3</sup>,  
Зинченко В.П.<sup>1</sup>, Гончаров Н.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,  
Ленинградская обл., Россия

<sup>3</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание головного мозга, характеризующееся накоплением фибриллярного белка амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ), а также образованием нейрофибриллярных клубков – гиперфосфорилированных тау-белков, в норме ассоциированных с микротрубочками. Фосфорилирование обуславливает агрегацию белка и перевод его в нерастворимую форму. Пептиды  $A\beta$  продуцируются при ферментативном расщеплении белка-предшественника амилоида (APP). Данные, полученные на моделях БА на трансгенных животных, указывают, что накопление  $A\beta$  в нейронах в патогенезе БА является более ранним событием, вызывающим когнитивный дефицит, чем отложение нерастворимых бляшек [1]. В современных исследованиях показано, что длинные изоформы внутриклеточного  $A\beta$  ( $iA\beta$ ), такие как  $A\beta_{45}$ , агрегируют в нейронах, тогда как более короткие изоформы секретируются. Возрастные изменения в процессинге  $A\beta$ , а также дисфункция металлопротеаз семейства эндотелинпревращающих ферментов (ECE) увеличивают уровень  $A\beta_{45}$ , гидрофобные свойства которого способствуют агрегации [2,3]. Пептиды  $A\beta_{45}$  не только накапливаются в митохондриях, эндосомах и аутофагосомах, но и



высвобождаются во внеклеточное пространство через экзосомы. Накопление  $\text{A}\beta$  связано с лимфатической системой, в частности с паравазкулярным путем, который играет ключевую роль в клиренсе основной фракции внеклеточного  $\text{A}\beta$ , опосредованного аквапорином 4 астроглии (AQP4) [4]. С помощью моноклональных антител было показано, что внутринеурональное накопление растворимого  $\text{A}\beta$  распространяется по всей энторинальной коре и гиппокампу, и что эта фаза амилоидной патологии устанавливается в уязвимых для БА регионах до отложения бляшек  $\text{A}\beta$  и образования нейрофибрилярных клубков [1]. Амилоидный паттерн, связанный с БА, отличается от типичного паттерна нейродегенерации, выявляемого с помощью МРТ, и наиболее выражен в обонятельной системе и гиппокампе [5]. Энторинальная кора (ЭК), («ворота» для информации, поступающей и покидающей гиппокамп) играет роль в экспрессии новой и консолидированной памяти, демонстрируя самые ранние нарушения мозговой активности на доклинической стадии [6]. На мышиных моделях доклинической формы БА [7] показана ранняя дисфункция спайковой активности в ЭК (без явных нарушений памяти), за которой следовали нарушения спайковой активности в гиппокампе, а далее, после появления нарушений пространственной памяти, следовала стадия слабоумия [8]. При БА сначала разрушаются нейроны и их связи в отделах мозга, связанных с памятью, включая ЭК и гиппокамп [9]. Позже поражаются области коры головного мозга, ответственные за пространственную навигацию, язык, мышление и социальное поведение.

**Серотонинергическая система мозга.** Важным компонентом системы регуляции головного мозга является серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ). 5-НТ действует как тканевый гормон, нейротрансмиттер и нейромодулятор. В ЦНС серотонин вырабатывается небольшим скоплением нейронов, расположенных в ядрах шва среднего мозга. Эти нейроны иннервируют многочисленные области мозга как рострально, так и каудально. 5-НТ является одним из наиболее изученных нейротрансмиттеров из-за его роли как в общих физиологических функциях, так и в патогенезе некоторых психических заболеваний человека (депрессия, шизофрения, обсессивно-компульсивные расстройства) [10,11]. Рецепторы 5-НТ чрезвычайно разнообразны. В основном это метаботропные рецепторы, сопряженные с различными G-белками. Описано семь семейств (5-НТ<sub>1-7</sub>R), которые модулируют многие физиологические функции, среди которых цикл сна-бодрствования, аппетит, настроение, обучение и память. Рецепторы 5-НТ<sub>2A</sub>, 5-НТ<sub>2C</sub> и 5-НТ<sub>4</sub> могут модулировать активность секретаз, влияя на процессинг APP; более того, рецепторы 5-НТ<sub>4</sub> напрямую взаимодействуют с альфа-секретазой (ADAM10) и снижают производство

Аβ. В головном мозге 5-HT<sub>4</sub>R экспрессированы в гипоталамусе, гиппокампе, прилежащем ядре, вентральном паллидуме, миндалевидном теле, базальных ганглиях, обонятельных луковицах, лобной коре, в области перегородки и в черной субстанции. Область гиппокампа имеет плотную серотонинергическую иннервацию, происходящую от медиального и дорсального ядер шва. Активация 5-HT<sub>4</sub>R вносит значительный вклад в когнитивные функции, влияя на изменения синаптической силы в отдельных структурах гиппокампа. Образование гиппокампа представляет собой трехслойную аллокортикальную структуру, включающую зубчатую извилину (ЗГ), собственно гиппокамп (который подразделяется на три поля: СА3, СА2 и СА1) и основание гиппокампа (субикулум) [12,13]. Кроме того, 5-HT<sub>4</sub>R играют роль в развитии БА, поскольку было показано, что экспрессия этих рецепторов снижена у пациентов, страдающих БА.

**Серотонин и астроциты.** Гипертрофия астроцитов, расположенных в непосредственной близости от «сенильных бляшек», была одной из основных патологий, выявленных Альцгеймером в 1910 г., и в настоящее время признана отличительной чертой БА и большинства других форм повреждения головного мозга и хронической нейродегенерации [14]. Астроциты покрывают огромное количество синапсов, контролируя синаптическую пластичность и передачу [15], клиренс нейротрансмиттеров [16] и мозговой кровотока [17], обеспечивая энергоснабжение нейронов и управляя ритмами возбуждения нейронов [18,19]. Активация сигнального пути 5-HT<sub>4</sub>R-Gα13 астроцитов индуцировала активацию малой ГТФазы, RhoA, увеличение фракции F-актина и морфологические изменения в этих клетках [20], которые могут иметь решающее значение для формирования и поддержания пластичности синапсов [21,22]. Т.о., астроцитарная ось 5-HT<sub>4</sub>R-Gα13-RhoA участвует в регуляции возбуждающих синаптических цепей [20]. В диссоциированных культурах фармакологическая активация 5-HT<sub>4</sub>R увеличивала частоту спонтанного синаптического высвобождения глутамата [23,20].

**БА, серотонин и терапия.** Этиология и патогенез нейродегенеративных заболеваний, включая БА, многофакторны, поэтому одна из стратегий лечения – разработка препаратов, которые могут действовать на несколько мишеней, связанных с патогенезом болезни. В частности, БА сопряжена с уменьшением количества серотонинергических нейронов в ядрах шва, главным образом из-за накопления гиперфосфорилированного тау-белка в этой области мозга. Кроме того, отложения Аβ в местах проекции серотонинергических нейронов могут вызывать ретроградную дегенерацию этих нейронов. Мембранные рецепторы 5-НТ взаимодействуют с множеством

медицинских препаратов и психоактивных веществ. Активация рецепторов запускает внутриклеточные процессы, влияющие на активность других медиаторных систем – глутаматной, дофаминовой и ГАМК. Серотонин-селективные антидепрессанты значительно улучшают симптомы депрессии и повседневную активность у пациентов с БА и используются для лечения агрессивного поведения. Модулируя как пролиферацию, так и выживание новообразованных клеток, серотонин является ключевым регулятором нейрогенеза у взрослых [24] и участвует в антидепрессивных механизмах [25]. Активация 5-НТ4-рецепторов может улучшать когнитивные симптомы благодаря их известной способности усиливать высвобождение ацетилхолина [26] и, до некоторой степени, компенсировать дефицит холинэргической передачи при БА. Уровень экспрессии рецепторов 5-НТ4 в гиппокампе коррелирует с качеством памяти [27].

Для терапии БА представляются многообещающими гибридные молекулы, сочетающие в себе антихолинэстеразную активность и высокую аффинность к G-белок связанным рецепторам. Так, синтезированы ингибиторы холинэстераз, которые с высокой селективностью действуют на гистаминовые рецепторы 3 типа (hH3R), регулирующие высвобождение ацетилхолина [28], на каннабиноидные рецепторы 2 типа (hCB2R), модулирующие процессы «молчаливого» периода БА – нейровоспаление, оксидативный стресс и митохондриальную дисфункцию [29], а также на серотониновые рецепторы 5-НТ<sub>6</sub>, способствующие высвобождению ацетилхолина [30] и 5-НТ<sub>4</sub>, стимуляция которых замедляет образование внеклеточных амилоидных бляшек [31]. Одним из первых агонистов 5-НТ<sub>4</sub> рецепторов класса бензимидазолонов был препарат ВМУ-8, способный проходить через ГЭБ. Он ослабляет дыхательную депрессию путем активации комплекса пре-Бетцингера, находящегося в дыхательном центре ствола мозга. Также у этого соединения была обнаружена способность усиливать мозговую активность и повышать способность к обучению и запоминанию. Полагают, что эффекты являются результатом положительного влияния активации 5-НТ<sub>4</sub>-рецепторов на выработку ацетилхолина [32].

Многофункциональные лиганды предполагается использовать не только для симптоматической, но и для патогенетической терапии. Однако реализация этой идеи сопряжена с целым рядом взаимосвязанных проблем: а) высокая молекулярная масса гибридных молекул; б) низкая биодоступность при пероральном введении; в) неспособность преодолевать гематоэнцефалический барьер; г) действие компонентов гибридной молекулы в различных диапазонах концентраций; д) необходимость оптимизации селективности и средства к разным

мишеням. Необходимо учитывать эти проблемы и на самых первых этапах производить соответствующие расчеты, прежде чем приступать к исследованиям на животных. Недавно нами предложен алгоритм разработки т.н. «функциональных бинаров», совмещающих свойства ингибиторов холинэстераз и активаторов 5-HT<sub>1A</sub> [33]. На первом этапе была сформирована группа замещенных 1,3-дигидро-2-оксо-1H-бензимидазол-2-онов для последующего синтеза. Посредством ПО «Percepta» были произведены теоретические расчеты logP, logBB и LD50 (мг/кг) для мышей и крыс. На основе полученных данных были выбраны наиболее перспективные соединения, которые были впоследствии синтезированы, и в условиях *in vitro* исследована их антихолинэстеразная активность. Для дальнейшего изучения были выделены соединения 16 и 29 с токсичностью, сопоставимой с VIMU-8. Соединения 13, 22 и 27 обладают более низкой токсичностью в сравнении с VIMU-8. Проведенный биохимический анализ показал способность полученных структур ингибировать АХЭ и БХЭ. Их активность по отношению к серотониновым рецепторам предстоит изучить на следующем этапе экспериментальных исследований. Соединение 13 с наиболее гидрофобным фрагментом в положении R2, с наиболее подвижным фрагментом с менее жестким скелетом в положении R3 показывает лучшие результаты в сравнении с VIMU-8. Минимальная пероральная токсичность, высокая ингибирующая способность по отношению к БХЭ наряду с низкой ингибирующей способности по отношению к АХЭ позволяет нам отметить вещество 13 как наиболее перспективное для дальнейшей экспериментальной разработки.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Welikovich L.A., Do Carmo S., Maglóczy Z. et al. // *Acta Neuropathol.* 2018. 136: 901-17.
2. Pacheco-Quinto J., Clausen D., Pérez-González R. // *FASEB J.* 2019. 33: 3758-71.
3. Brewer G.J., Herrera R.A., Philipp S. // *J. Alzheimers Dis.* 2020. 73: 229-46.
4. Feng W., Zhang Y., Wang Z. et al. // *Alzheimers Res. Ther.* 2020. 12: 125.
5. La Joie R., Perrotin A., Barre L. et al. // *J. Neurosci.* 2012. 32: 16265-73.
6. Kunz L. et al. // *Science*, 2015. 350(6259): 430-3.
7. Saito T. et al. // *Nat Neurosci.* 2014. 17(5): 661-3.
8. Jun H. et al. // *Neuron.* 2020. 107(6): 1095-112.
9. Olajide O.J., Suvanto M.E., Chapman C.A. // *Biol. Open.* 2021. 10(1): bio056796.
10. Martinowich K., Lu B. // *Neuropsychopharmacology.* 2008. 33(1): 73-83.
11. Nordquist N., Orelund L. // *Ups. J. Med. Sci.* 2010. 115(1): 2-10.
12. Scharfman H.E., Witter M.P., Schwarcz R. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000. 911: ix-xiii.
13. Balestrieri J.V.L., Nonato M.B., Gheler L., Prandini M.N. // *Rev. Assoc. Med. Bras.* (1992). 2020. 66(4): 512-5.

14. Robinson C., Apgar C., Shapiro L.A. // *Neural. Plast.* 2016. 2016: 1347987.
15. Allen N.J., Eroglu C. // *Neuron.* 2017. 96(3): 697-708.
16. Bellot-Saez A., Stevenson R., Kékesi O. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22(5): 2520.
17. Takahashi S. // *Cells.* 2022. 11(5): 813.
18. Camandola S. // *Cell Stress.* 2018. 2(10): 246-52.
19. Hablitz L.M., Plá V., Giannetto M. et al. // *Nat Commun.* 2020. 11(1): 4411.
20. Müller F.E., Schade S.K., Cherkas V. et al. // *Glia.* 2020. 69(4): 872-89.
21. Mlinar B., Mascaldi S., Mannaioni G. et al. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. 24: 719-31.
22. Schill Y., Bijata M., Kopach O. et al. // *Commun Biol.* 2020. 3: 76.
23. Zhou B., Zuo Y., Jiang R. // *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2019. 25(6): 665-73.
24. Alenina N., Klempin F. // *Behav. Brain Res.* 2015. 15(277): 49-57.
25. Kronenberg G., Petermann M., Dormann C. et al. // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 268: 861-4.
26. Bijak M., Misgeld U. // *Neuroscience.* 1997. 78(4): 1017-26.
27. Lecoufflet P., Roux C.M., Potier B. et al. // *Cereb Cortex.* 2021. 31(1): 694-701.
28. Darras F.H., Pockes S., Huang G. et al. // *ACS Chem. Neurosci.* 2014. 5: 225-42.
29. Dolles D., Hoffmann M., Gunesch S. et al. // *J. Med. Chem.* 2018. 61: 1646-63.
30. Szalaj N., Godyń J., Jończyk J. et al. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2020. 35: 1944-52.
31. Rochais C., Lecoutey C., Gaven F. et al. // *J. Med. Chem.* 2015. 58: 3172-87.
32. Berque-Bestel I., Lezoualc'h F. // In: Martinez A. (ed.) *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease: V2: Neuronal Plasticity.* RSC Publishing, London. 2010. 169-85.
33. Челуснова Ю.В., Воронина П.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023. 175(3): 326-34.

## АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ФРАГМЕНТА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

*Иванова В.П.*

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Альбумины составляют более половины всех белков плазмы. Эти белки играют важную роль буфера, поддерживающего рН на физиологическом уровне и онкотическое давление плазмы. Альбумины осуществляют перенос с током крови различных соединений, таких как катионы, жирные кислоты, липофильные гормоны, лекарственные вещества и др. Помимо транспортной функции альбумины участвуют в регуляции распределения жидкости между плазмой и межклеточным пространством. Альбумины легко проникают из сосудов в межклеточное пространство [1,2].

Все существующие белки периодически обновляются. Известно, что время жизни альбуминов составляет 27 дней, после чего они подвергаются процессам ферментативного распада. В ходе ограниченного протеолиза этих белков могут высвобождаются пептидные фрагменты различной длины, обладающие собственной биологической активностью [3].

В представленной работе исследовали влияние олигопептида Phe-Gly-Glu-Arg (FGER), соответствующего фрагменту 206–209 сывороточного альбумина человека, на адгезию эпителиоподобных клеток.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали эпителиоподобную линию клеток CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells, клетки яичника китайского хомячка). Клетки выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. В экспериментах использовали клетки, достигшие субмонослоя.

Для оценки влияния синтетического пептида FGER на клеточную адгезию пептид (в концентрации от 10<sup>-10</sup> до 10<sup>-5</sup> М) вносили в клеточную суспензию в полной питательной среде перед экспериментом. Клеточную суспензию (10<sup>6</sup>/мл) переносили в 96-луночные планшеты (Corning, США), предварительно обработанные или необработанные раствором желатина (20 мкг/мл в PBS, 18 ч при 4°C, здесь и далее) или поли-L-лизина (0.01%) и выдерживали их 1 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Процесс расплывания клеток изучали на чашках Петри, покрытых или нет раствором желатина (см. выше), в которые вносили клетки (2×10<sup>5</sup>/мл) в питательной среде с добавлением 0.2% сыворотки. Пептид в концентрации от 10<sup>-10</sup> до 10<sup>-5</sup> М вносили в клеточную суспензию непосредственно перед посевом клеток на чашки Петри. После этого клетки выдерживали 45 мин при 37°C. Учитывали количество расплывшихся клеток, используя микроскоп Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В работе исследовали влияние тетрапептида FGER на адгезивную способность эпителиоподобных клеток CHO-K1. Оценивали клеточный ответ под действием пептида на разных субстратах клеток: культуральном пластике и на пластике, покрытом поли-L-лизином (синтетическим поликатионом) или желатином (природным биodeградируемым полимером).

Пептид FGER стимулировал процесс прикрепления изученных клеток на необработанном пластике. Культивирование клеток с пептидом FGER приводило к увеличению числа прикрепившихся клеток при концентрациях  $10^{-10}$  –  $10^{-9}$  М ( $P < 0.01$ ) и  $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  М ( $P < 0.05$  или  $P < 0.01$ ).

Адсорбция поли-L-лизина или желатина на культуральном пластике по-разному влияла на способность клеток, обработанных пептидом, прикрепляться к твердой поверхности. Пептид FGER, внесенный в питательную среду, не влиял на адгезию эпителиоподобных клеток к синтетическому поликатиону поли-L-лизину.

Одновременно пептид увеличивал количество прикрепившихся клеток к желатину в широком диапазоне концентраций по сравнению с контрольными клетками. Количество прикрепившихся клеток на желатине под действием пептида FGER увеличивалось по сравнению с таковым на необработанном пластике. При этом пептид стимулировал клеточную адгезию на желатине в концентрации от  $10^{-10}$  до  $10^{-6}$  М ( $P < 0.01$  или  $P < 0.001$ ).

Установлено, что пептид FGER участвует в регуляции процессов распластывания клеток линии CHO-K1. Исследованный пептид стимулировал распластывание клеток, как на необработанном пластике, так и на пластике, покрытом желатином, во всем диапазоне исследованных концентраций. Интересно отметить, что прирост распластанных клеток на желатине под действием пептида FGER существенно возрастает в дозах  $10^{-10}$  (в 1.46 раза),  $10^{-6}$  (в 1.48 раза) и  $10^{-5}$  М (в 1.23 раза) по сравнению с аналогичными значениями на необработанном пластике.

Полученные нами данные о регуляции пептидом FGER адгезивной способности клеток линии CHO-K1 на стадии прикрепления и распластывания клеток свидетельствуют о вовлечении в этот процесс молекул адгезии интегринов. Косвенным подтверждением этого положения являются данные об отсутствии влияния исследованного пептида на адгезию клеток к поли-L-лизину. Возможно, это связано с неспецифическим характером образующихся электростатических связей между  $\text{NH}_2$ -группами поликатиона и фосфатными группами фосфолипидных молекул клеточных мембран в процессе прикрепления клеток к поли-L-лизину [4].

Известно, что скорость прикрепления клеток к субстрату зависит от продолжительности первичных контактов клеток с адгезивной поверхностью. Возможной причиной относительного уменьшения скорости прикрепления клеток на пластике после действия пептида может быть увеличение у клеток периода адаптации к условиям микроокружения, что может быть связано, главным образом, с синтезом молекул ВКМ [5] и экспрессией интегриновых рецепторов [6].

Пептид FGER может регулировать активность интегринов посредством аллостерического взаимодействия с разными участками рецепторной молекулы, приводя к различным конформационным перестройкам рецептора. В результате этих процессов может изменяться степень рецепторного взаимодействия с лигандами, замедляя или ускоряя лиганд-рецепторное связывание. Доля лиганд-связанных рецепторов, в свою очередь, может определять степень кластеризации интегринов [7]. Это означает, что чем больше количество лиганд-связанных интегринов имеется в клеточной мембране, тем крупнее формирующиеся кластеры рецепторов, и наоборот.

При переходе клетки к распластыванию размеры формирующихся адгезионных структур определяют процесс их созревания. Часть мелких адгезионных комплексов распадается, другие укрупняются и рекрутируют дополнительные белки с различными свойствами. Можно предположить, что пептид FGER при высеве клеток на желатин ускорял процессы кластеризации интегринов за счет увеличения скорости диффузии рецепторов в плоскости клеточной мембраны. В конечном итоге, пептид FGER увеличивал скорость укрупнения кластеров интегринов, а значит и адгезионных структур при высеве клеток на желатин.

Полученные в работе данные дают основание полагать, что молекулы сывороточного альбумина могут выступать в роли предшественников коротких пептидов с выраженной биологической активностью. Пептидные фрагменты могут высвобождаться в ходе неполного протеолиза альбуминов и включаться в процесс регулирования адгезионных характеристик резидентных клеток, локализованных в тканях по ходу следования кровеносных сосудов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бордаков П.В., Доронин М.В., Бордаков В.Н. и др. // Военная медицина. 2020. 2: 24-7.
2. Chruszcz M., Mikolajczak K., Mank N. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. 1830: 5375-81.
3. Pavan S., Luisi I., Fontanive G. et al. // PLOS ONE. 2013. 8: e56469.
4. Reuter M., Schwieger C., Meister A. et al. // Biophys. Chem. 2009. 144: 27-37.
5. Xu J., Mosher D. // Fibronectin and other adhesive glycoproteins. In: The extracellular matrix: an overview. – 2011. Berlin: Springer-Verlag: 41-75.
6. Takada Y., Ye X., Simon S. // Genome Biol. 2007. 8: a215.
7. Selhuber-Unkel C., Lopez-Garcia M., Kessler H. et al. // Biophys. J. 2008. 95: 5424-31.



## ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АСТРОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ

*Иванов О.А.<sup>1</sup>, Горбачева Л.Р.<sup>1,2</sup>, Колмогоров В.С.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский технологический университет  
МИСиС, Москва, Россия

**Введение.** Инсульт является следствием нарушения мозгового кровотока, сопряженного с тромбообразованием и появлением активных факторов свертывания, что также ведет к развитию нейровоспаления, в ходе которого происходит нарушение целостности ГЭБ и проникновение активных факторов гемостаза в ткань мозга. Тромбин, ключевая сериновая протеаза гемостаза, способен активировать специфические протеаза-активируемые рецепторы (ПАР) [1,2], которые широко экспрессируются в мозге [3]. Существует 4 типа ПАР. На данный момент показано, что тромбин способен активировать ПАР-1, -3 и -4 [5]. Экспрессия ПАР показана, в частности, в астроцитах, которые являются важным клеточным участником и регулятором нейровоспаления [2]. При этом ведущую роль в провоспалительной активации астроцитов играет ПАР1 [4]. Таким образом, данная работа посвящена изучению ПАР1-опосредованного действия тромбина на культивируемые астроциты.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на первичных культурах астроцитов крысы. Культуру клеток получали из коры больших полушарий новорожденных крыс (0-3 дней) по протоколу, описанному ранее [5].

Пролиферацию клеток измеряли методами МТТ и WST-1. В основе этих методов лежит восстановление солей тетразолия МТТ и WST-1 до формазана оксидоредуктазами митохондрий живых клеток, после чего осуществляется спектрофотометрическое (BioRad, Microplate Absorbance Reader, iMark™) измерение количества восстановленного продукта на длине волны поглощения 530 нм (МТТ) и 450 нм (WST-1).

Секрецию NO измеряли по накоплению нитрит-ионов в среде культивирования с помощью реактива Грисса. Уровень β-гексозаминидазы в среде культивирования астроцитов и внутриклеточный уровень фермента оценивали по фермент-субстратной реакции с использованием окрашенного субстрата (4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозамин).

Топографию и жесткость (модуль Юнга) мембраны клеток исследовали с использованием сканирующей ион-проводящей

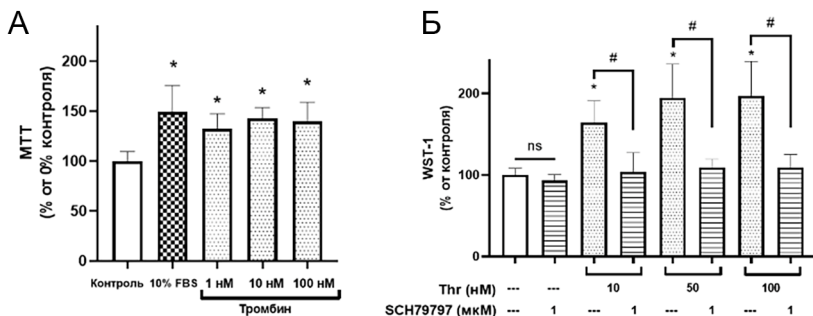
микроскопии (SICM; сборка ICAPPIC Limited, Великобритания) на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-2 (Nikon, Япония)

Сразу после сканирования на SICM клетки фиксировались с помощью PFA 4% при комнатной температуре в течение 20 минут, и проводилось окрашивание клеток на F-актин с помощью Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen™) и на ядерный хроматин с помощью Hoechst 33342 (Invitrogen™) по методике, описанной ранее [3]. Детекцию флуоресценции проводили на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 510 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения ZEN.

Для определения вклада ПАP1 в активацию клеток использовали агонист ПАP1, TRAP6, и антагонист ПАP1, SCH79797.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием GraphPad Prism 8.0.1.

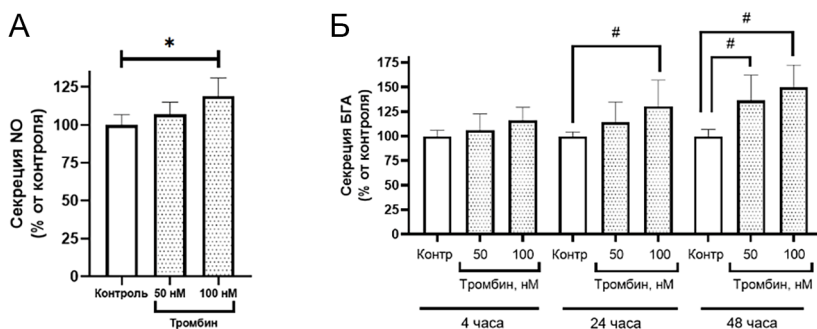
**Результаты и обсуждение.** Апликация тромбина в концентрациях 1-100 нМ через 48 часов приводила к повышению пролиферации астроцитов на 30-40% по сравнению с контролем (рис. 1А). При этом блокада ПАP1 антагонистом SCH79797 (1 мкМ) приводила к полной отмене этого эффекта тромбина. В результате уровень пролиферации не отличался от значений в контроле (рис. 1Б). Таким образом, показано, что тромбин стимулирует пролиферацию астроцитов преимущественно через ПАP1. Данный процесс, вероятно, опосредуется по внутриклеточному сигнальному пути с вовлечением  $G\alpha_q$  белка [6].



**Рис. 1.** Изменение пролиферации астроцитов на фоне действия тромбина. А – пролиферация астроцитов, измеренная МТТ-методом, на фоне действия тромбина или наличия в клеточной среде 10% FBS (положительный контроль). Б – пролиферация астроцитов, измеренная WST-1-методом на фоне действия тромбина или SCH79797 (антагонист ПАP1) + тромбин. Результаты представлены как Mean  $\pm$  SD. \*, # –  $p < 0.0001$  – различия достоверны по сравнению с контролем и группой без антагониста, соответственно, по One-way ANOVA с поправкой Даннета на множ. сравнение. N (кол-во измеренных лунок) = 15, независимых экспериментов  $\geq 3$ .

Применение тромбина в концентрации 100 нМ вызывало значимое повышение секреции NO на 19% через 48 часов, тогда как при воздействии тромбина (50 нМ) происходило снижение высвобождения NO (NO лишь на 7% выше, чем в контроле, рис. 2А).

Секрецию  $\beta$ -гексозаминидазы, фермента лизосом, анализировали через 4, 24 и 48 часов после воздействия тромбина. Значимое повышение секреции  $\beta$ -гексозаминидазы на 30.5% наблюдалось через 24 часа после воздействия тромбина в концентрации 100 нМ. Спустя 48 часов значимое повышение фермента наблюдалось и при 50 нМ тромбина на 36.5%, и при 100 нМ тромбина на 50% (рис. 2Б). Следовательно, можно предположить более высокую специфичности тромбина по индукции секреции  $\beta$ -гексозаминидазы, в сравнении с NO.

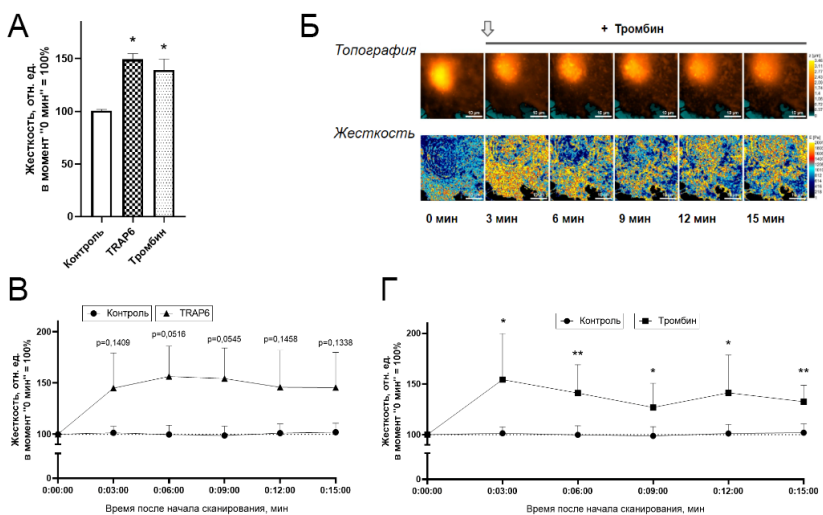


**Рис. 2.** Изменение секреции NO (А) и  $\beta$ -гексозаминидазы (Б) при действии тромбина на астроциты. А – секреция NO астроцитами на фоне действия тромбина (реактив Грисса). Б – секреция  $\beta$ -гексозаминидазы астроцитами при действии тромбина через 4, 24 и 48 после воздействия (фермент-субстратная реакция). Секреция БГА измерена как отношение содержания фермента в культивируемой среде к общему количеству фермента внутри и вне клеток. Значения представлены в относительных величинах по отношению к контролю, принятому за 100%, как Mean  $\pm$  SD. \*, # –  $p < 0.0001$  – различия достоверны по сравнению с контролем или с другой опытной группой, соответственно. One-way ANOVA с поправкой Даннета на мн. ср. N (кол-во измеренных лунок)  $\geq 9$ , кол-во независимых экспериментов  $\geq 3$ .

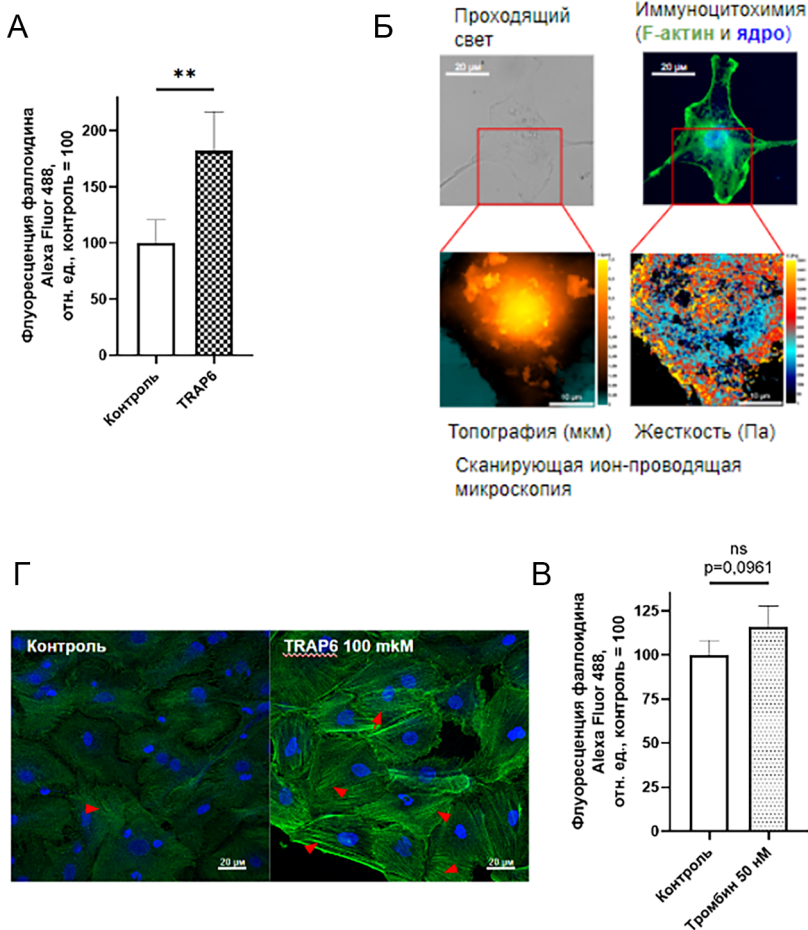
Ранее методом сканирующей ион-проводящей микроскопии на клетках линии РС-3 было показано, что при обработке клеток цитохалазином нарушается полимеризация актина, что приводит к изменению жесткости мембраны клеток, преимущественно на периферии клеток [7]. До настоящего времени не было данных об изменении жесткости мембраны (модуль Юнга) в условиях провоспалительной активации астроцитов. С помощью метода сканирующей ион-проводящей микроскопии в режиме измерения жесткости было показано, что

применение тромбина (50 нМ) и агониста ПАР1, TRAP6 (100 мкМ) жесткости клеточной мембраны возрастала уже через 3 минуты после воздействия, которое сохранялось в течение всех 15-ти минут сканирования (рис. 3В, Г). В среднем, за все время сканирования жесткость при воздействии TRAP6 увеличилась на 49%, а при воздействии тромбина – на 39% (рис. 3А).

Состояние актинового цитоскелета, уровень полимеризации F-актина, определяли как среднюю интенсивность флуоресценции меченного фаллоидина в клетке. Так, воздействие тромбина (50 нМ) повышало сборку F-актина на 16% (рис. 4В) а TRAP6 (100 мкМ) – на 82% по сравнению с контрольными условиями (рис. 4А). Таким образом, можно предположить, что полимеризация актина может частично обеспечивать повышенную жесткость мембраны в астроцитах при их ПАР1-зависимой активации.



**Рис. 3.** Изменение жесткости мембраны (модуль Юнга) астроцитов на фоне действия тромбина и агониста ПАР1, TRAP6, измеренные методом SICM. А – средняя жесткость мембраны астроцитов в промежутке 3-15 минутного сканирования. \* –  $p < 0.0001$  – различия достоверны по сравнению с контролем, One-way ANOVA с поправкой Даннета на мн. ср. Б – репрезентативный снимок топографии (верхний ряд) и жесткости (нижний ряд) участков мембраны клеток, полученных методом SICM. Масштаб – 10 мкм. Тромбин добавляли после контрольного сканирования (точка 0 мин.). В – изменение жесткости мембраны астроцитов на фоне действия агониста ПАР1, TRAP6. Г – изменение жесткости мембраны клеток при действии тромбина. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  – различия достоверны по сравнению с контролем, Two-way ANOVA с поправкой Даннета на мр. ср. Результаты представлены как Mean  $\pm$  SD.



**Рис. 4.** Влияние тромбина и агониста ПАР1, TRAP6, на состояние актинового цитоскелета астроцитов. А – изменение флуоресценции фаллоидина-Alexa Fluor 488, маркирующего F-актин, при воздействии TRAP6. Б – сравнение распределения жесткости (модуль Юнга) и F-актина в астроците. Приведены репрезентативная фотография клетки в проходящем свете, изображение иммуноцитохимически окрашенного астроцита, его топографии и распределения жесткости. В – изменение флуоресценции фаллоидина-Alexa Fluor 488, маркирующего F-актин, при воздействии тромбина. Г – пример иммуноцитохимического окрашивания контрольной культуры и культуры, инкубированной с TRAP6 в течение 20 мин. F-актин указан стрелками.

Таким образом, установлено, что ПАР1-зависимая провоспалительная активация астроцитов повышает пролиферацию, секрецию, а также жесткость клеточной мембраны, вероятно, в результате полимеризации F-актина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Suo Z., Citron B.A., Festoff B.W.* // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2004. 3(1): 105-14.
2. *Ye F., Garton H.J.L., Hua Y. et al.* // *Transl. Stroke Res.* 2021. 12: 496-511.
3. *Wang H., Reiser G.* // *Biol Chem.* 2003. 384(2): 193-202.
4. *Gorbacheva, L.R., Kiseleva, E.V., Savinkova, I.G. et al.* // *Biochemistry Moscow.* 2017. 82: 778-90.
5. *Ivanova A.E., Gorbacheva L.R., Strukova S.M. et al.* // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A.* 2014. 8: 50-9.
6. *Coughlin S.* // *Nature.* 2000. 407: 258-64.
7. *Kolmogorov V.S., Erofeev A.S. et al.* // *Nanoscale.* 2021. 13(4): 6558-68.

## ВЛИЯНИЕ ПОПЕРЕЧНОСШИТЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ

*Ивановская Е.В.<sup>1,2</sup>, Болдова А.Е.<sup>1</sup>, Сидорина А.Н.<sup>4</sup>, Ивановская Ю.А.<sup>4</sup>,  
Газитаева З.И.<sup>4</sup>, Свешникова А.Н.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

<sup>4</sup>ООО «Медицинские биологические системы», Москва, Россия

**Введение.** В организме человека гиалуроновая кислота (НА) встречается практически во всех тканях: во внеклеточном матриксе клеток (с наибольшим распределением вокруг клеток кожи), в соединительной ткани, суставной ткани, а также стекловидном теле. Полимер представляет собой несulfатированный линейный гликозаминогликан с отрицательным зарядом, содержащий повторяющиеся единицы дисахарида  $\beta$ -1,4-D-глюкуроновая кислота- $\beta$  1,3-D-N-ацетилглюкозамин- $\beta$ -1,4 [1]. С возрастом естественный синтез НА в организме замедляется, а процессы распада начинают преобладать, что приводит к уменьшению

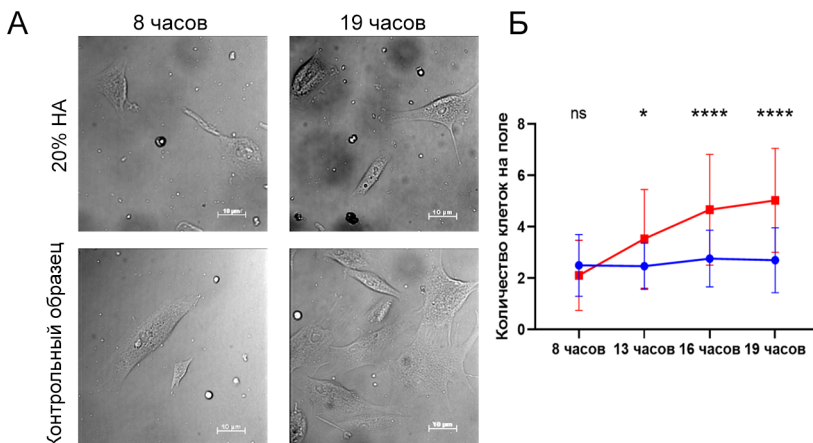
содержания гиалуроната в эпидермисе. Известно, что НА поддерживает структуру межклеточного матрикса, а также играет ключевую роль в пролиферации и миграции фибробластов и других клеток стромы, которые активируются гиалуроновой кислотой, предположительно, в результате ее связи со специфическими рецепторами, в первую очередь, CD44 [2,3]. Известно, что НА ускоряет пролиферацию фибробластов и синтез коллагена и неколлагеновых белков [4,5].

В настоящей работе исследуется влияние поперечносшитых производных НА, предполагаемых к использованию в эстетической медицине, на пролиферацию фибробластов человека. Мы показываем, что в присутствии поперечно сшитого продукта гиалуроновой кислоты скорость деления одиночных фибробластов увеличивается в 2 раза.

**Материалы и методы.** Исследуемым образцом являлся гель на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, сшитой дивинилсульфоном, а его влияние на клеточную культуру изучалось на фибробластах кожи человека (2-3 пассаж) (HDF, ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова). Культивирование фибробластов проводилось по стандартным протоколам [6]. Вкратце, HDF рассеивались в чашки Петри, содержащие стерилизованные покровные стекла в концентрации 10 тыс./см<sup>2</sup> и культивировались при 37°C в атмосфере 95% влажности при 5% CO<sub>2</sub>.

Для исследования пролиферации одиночные фибробласты иммобилизовывались на покровные стекла, содержащие каплю поли-L-лизина диаметром 30 мкм. Анализ деления клеток проводили в течение 20 часов при 37°C в атмосфере 95% влажности 5% CO<sub>2</sub> на конфокальном микроскопе.

**Результаты.** В экспериментах наблюдался процесс деления одиночных фибробластов, иммобилизованных на покровном стекле, в полной среде с добавлением 20% (v/v) HBSS (контроль) или в полной среде с добавлением 20% исследуемого образца (рис. 1А). Снимки были получены методом конфокальной микроскопии в режиме дифференциального интерференционного контраста, а также была построена гистограмма, отображающая количественные данные (рис. 1Б). Исходя из полученных данных, мы можем наблюдать, что пролиферация происходила и в отсутствие исследуемого образца в среде. Однако в его присутствии значительно повышается скорость деления фибробластов. В таких условиях количество клеток на поле через 20 часов инкубации было задетектировано вдвое больше, чем в полной среде. В обоих случаях морфологических отличий между фибробластами не было выявлено (рис. 1А).



**Рис. 1.** Наблюдение пролиферации фибробластов человека в присутствии НА. Конфокальная микроскопия (режим дифференциального интерференционного контраста). А. Приведены типичные фотографии из  $n = 10$ . Б. Влияние образца на пролиферацию фибробластов. Синий – контрольный образец, красный – образец в присутствии 20% НА. Статистическая значимость различий указана по критерию Манна-Уитни.

**Закключение.** В результате исследования изучения влияния поперечносшитого дивинилсульфоном производного гиалурановой кислоты на пролиферацию фибробластов человека, можно сделать основные выводы, что добавление 20% образца оказывает положительное действие на деление фибробластов увеличивая вдвое количество клеток за одинаковое время инкубирования в сравнение со стандартной средой.

Увеличение скорости деления фибробластов обусловлено взаимодействием гиалурановой кислоты с её основным рецептором-CD44.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках договора на НИР между ЦТП ФХФ РАН и ООО «МЕДБИОСИСТЕМ».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zhu Y., Kruglikov I.L., Akgul Y., Scherer P.E. // *Matrix Biology*. 2019. 78: 284-91.
2. Bukhari S. N. A., Roswandi N. L., Waqas M. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. 120: 1682-95.
3. Dovedytis M., Liu Z.J., Bartlett S. // *Eng. Regen.* 2020. 1: 102-13.
4. Greco R.M., Iacono J.A., Ehrlich H.P. // *J. Cell Physiol.* 1998. 177: 465-73.
5. Mast B.A., Diegelmann R.F., Krummel T.M. et al. // *Matrix*. 1993. 13: 441-46.
6. Fernandes I., Russo F., Pignatari G. et al. // *Cytotechnology*. 2016. 68(2): 223-8.



ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДОФАМИНА С ИОННЫМИ  
КАНАЛАМИ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК  
*CHARA CORALLINA*

*Катаев А.А.*

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

**Введение** Важнейшими продуктами метаболизма в нейронах являются катехоламины, к которым относятся три близких по структуре производных тирозина – дофамин, норадреналин и адреналин. Дофамин и норадреналин являются нейромедиаторами. Молекулы дофамина, попадая в синаптическую щель, взаимодействуют с дофаминовыми рецепторами на постсинаптической мембране и, таким образом, участвуют в генерации потенциала действия, т.е. в передаче нервного импульса. Дофамин присутствует практически во всех отделах головного мозга, но в разных количествах. Повышение или снижение потока дофамина в постсинаптические нейроны мезолимбической системы мозга может привести к возникновению или развитию у пациентов таких патологий как шизофрения или паркинсонизм [1]. Дофамин контролирует и регулирует различные функции организма, включая двигательную активность, эмоции, когнитивную функцию, эндокринную регуляцию. О разнообразном функциональном действии дофамина в отдельных компартментах клетки и в организме в целом свидетельствует существование 5-ти изомеров дофаминовых рецепторов [D1-D5]. Влиянию дофамина на ионные каналы возбудимых клеточных мембран посвящено множество исследований, однако ясной картины механизмов его взаимодействия со структурными элементами возбудимых мембран нет. Так, дофамин существенно подавляет быструю инактивацию натриевых каналов нейронов коры головного мозга [2,3]. Активация дофаминовых рецепторов D1/D5 устойчиво модулировала  $\text{Na}^+$ -токи в префронтальных кортикальных нейронах крысы *in vitro* [4]. Эта модуляция имела потенциал - зависимый характер, увеличивая амплитуду токов при более отрицательных чем  $-40$  мВ потенциалах и уменьшая ее при более положительных чем  $-20$  мВ потенциалах. Действие дофамина в этом случае, возможно, опосредовано через многократную активацию вторичных мессенджеров сигнальных путей трансдукции [5,6]. Активация дофаминового рецептора D1 приводила к увеличению проводимости  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в начальной стадии взаимодействия дофамина с мембраной и в относительно малых концентрациях посредством активации протеинкиназы A и последующего фосфорилирования белковых субъединиц каналов [7]. В то же время взаимодействие дофамина с D1 рецептором инактивировало K-каналы и увеличивало

уровень цАМФ в клетке [8]. Однако, взаимодействие дофамина с D2 рецептором прямо модулировало  $K^+$ -каналы, увеличивая их активность. Увеличение активности  $K$ -каналов приводило к гиперполяризации клетки и потере способности генерировать потенциалы действия. Клетка при этом теряла возбудимость [3,7]. Ряд авторов [9-12] исследовали структурную, фармакологическую и биохимическую гомологию субтипов дофаминовых рецепторов. Было показано, что действие большей части наркотических препаратов сводится к увеличению синтеза дофамина (в 5-10 раз) в мезолимбических нейронах, расположенных в вентральной области покрышки у основания мозга и посылающих проекции в различные отделы переднего мозга [13]. В связи с этим вопрос о взаимодействии наркотических веществ с дофамином является важным этапом в разработке методов борьбы с наркоманией. Так, амфетамин напрямую стимулирует выброс дофамина, воздействуя на механизм его транспортировки [14]. Другие наркотики, такие как кокаин и психостимуляторы, блокируют естественные механизмы обратного захвата дофамина, увеличивая его локальную концентрацию в синаптическом пространстве. Морфий и никотин имитируют действие натуральных нейромедиаторов, а алкоголь блокирует действие антагонистов дофамина [13]. Внимание к проблемам нейрорецепции в последнее время объясняется тем, что причиной многих дисфункций нервной системы является нарушение целостности мембранных компонентов нейронов. До сих пор неизвестно, способен ли дофамин напрямую связываться со структурными элементами ионных каналов, блокировать их или, наоборот, активировать трансмембранные токи через них, нарушая ионный баланс и функциональное состояние клеток. Если имеет место связывание дофамина со структурными элементами канала, то каков характер оно носит – повреждающий необратимый или же обратимый. Не исследован вопрос о возможной взаимосвязи изменения актинового цитоскелета при взаимодействии его с дофамином и модулирования работы ионных каналов мембраны. В этой связи представляется перспективным исследование поставленных задач на весьма удобном объекте для электрофизиологических исследований – гигантских клетках харовой водоросли *Chara corallina*. Известно, что нейромедиаторы обнаружены не только в животных клетках, но и в растениях, где они выполняют регуляторную и сигнальную функции [15]. Мембраны клеток харовых водорослей – плазмалемма и тонопласт относятся к возбудимым мембранам и имеют набор ионных каналов ( $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$ ), которые по своим функциональным характеристикам гомологичны животным клеткам [16-22]. В частности показано, что потенциалуправляемые  $Ca^{2+}$ -каналы плазмалеммы клеток харовых водорослей по своим электрофизиологическим характеристикам, по наличию у них дигидропиридин-чувствительных рецепторов и

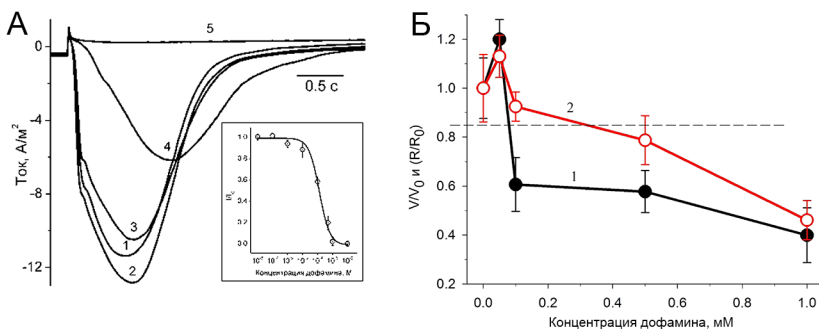
потенциалоуправляемости идентичны L-типу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов животных клеток [20,21]. При возбуждении открываются кальциевые каналы плазматической мембраны и внутриклеточная концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  возрастает и активирует С1-каналы.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые С1-каналы таким образом активируются повышением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в подмембранном компартменте клетки.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на интернодальных интактных клетках и на перфузируемых изнутри клетках харовой водоросли *Chara corallina* с предварительно удаленным тонопластом. Харовые водоросли выращивали в аквариумах в лабораторных условиях при температуре 18-20°C в искусственной прудовой воде, содержащей (в мМ): 0.1 KCl, 1.0 NaCl, 0.1  $\text{CaCl}_2$ . В режиме фиксации напряжения на центральном, рабочем участке клетки длиной 2 мм вели регистрацию переходного тока при изменении потенциала на мембране. Рабочая камера из тefлона имела 3 отсека, изолированные друг от друга воздушными мостиками. Процедура измерения токов подробно описана в работах [16,17]. С помощью потенциальных электродов измеряли разность напряжений на мембране  $V_M$ , и подачей прямоугольных импульсов тока величиной 0.01 мкА через токовые электроды, тестировали электрическое сопротивление плазматической мембраны. В норме удельное сопротивление мембраны  $R_M \sim 25 \pm 5 \text{ кОм} \times \text{см}^2$ . Для фиксации напряжения на мембране использовали специализированный операционный усилитель Dagan 8500 (USA). В качестве управляющего и регистрирующего устройства – компьютер с платой ЦАП/АЦП Data Translation DT2801A и Lcard 1250. Для мониторинга эксперимента использовали специализированный пакет программ Bio-Qest и Pclamp 6. Обработку полученных результатов вели с помощью специализированной программы WinWCP 4.4.7 разработанной в University of Strathclyde, SigmaPlot11 и Origin8. Растворы Tris, HEPES, EGTA и сахарозы (фирма Sigma Chemical. Co), NaCl, KCl, KOH (фирма Fluka.) готовили на деионизованной воде. В экспериментах использовали фармакологический препарат дофамина (Дофамин-гидрохлорид, Россия). Готовили 1 мл раствора дофамина-гидрохлорида (40 мг в 1 мл) в присутствии 10 мг метабисульфита натрия в качестве стабилизатора. Присутствие в экспериментальном растворе метабисульфита натрия на работу ионных каналов плазмалеммы не оказывало влияния. Раствор для внутриклеточной перфузии содержал (мМ): 5 EGTA, 6  $\text{MgCl}_2$ , 10 CsCl, 240 сахарозы, 10 HEPES/NaOH, pH 7.3. Внешний раствор (мМ): 0.1 KCl, 1 NaCl, 1.0  $\text{CaCl}_2$ , 160-180 сахарозы, 1 HEPES/NaOH, pH 7.3.

**Результаты и обсуждение** Характер влияния дофамина на интегральный ток плазмалеммы нативной клетки харовой водоросли *Chara corallina* зависел от его концентрации. На рисунке 1А (кривая 2) показано, что введение в омывающий клетку раствор 25 мкМ дофамина увеличивало амплитуду интегрального тока.

При дальнейшем увеличении концентрации нейромедиатора (до 75 мкМ) наблюдается рост тока утечки –  $I_L$  (рис. 1Б) и полное блокирование развития трансмембранного интегрального тока при концентрации дофамина 1.75 мМ (рис. 1А, кривые 3-5). Блокирование тока сопровождалось смещением максимума его амплитуды в область положительных потенциалов. Особенно наглядно это смещение выражено при концентрации дофамина 0.5 мМ.

Вероятнее всего, это увеличение амплитуды хлорного тока обусловлено тем, что при концентрации дофамина 25 мкМ происходит временное локальное повышение уровня свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Процесс этот нелинейный. Изменение концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме с уровня  $3 \times 10^{-8}$  М до  $5 \times 10^{-7}$  М приводит к увеличению амплитуды кальциевого тока, тогда как дальнейший процесс роста концентрации  $Ca^{2+}$  приводит к противоположному эффекту – уменьшению кальциевого тока. В диапазоне концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме от  $5 \times 10^{-6}$  до  $10^{-5}$  М кальциевые каналы L-типа инактивированы и соответственно нет кальциевого тока.

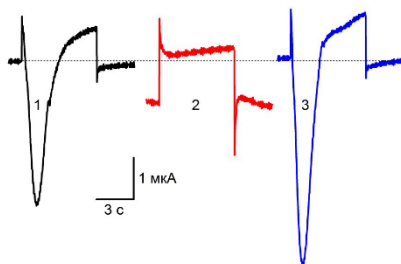


**Рис. 1.** А. Изменение амплитуды суммарного входящего тока плазмалеммы нативной клетки *Chara corallina* в присутствии различных концентраций дофамина: 1 – контроль; 2 – 25 мкМ; 3 – 75 мкМ; 4 – 125 мкМ; 5 – 1.75 мМ. Токвые кривые регистрировали через 12 мин после введения дофамина в омывающий клетку раствор. Наружный раствор содержал (в мМ): 0.1 KCl, 1.0 NaCl, 1.0 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 HEPES-Tris, pH 7.3. Потенциал покоя плазмалеммы  $V_m = -160$  мВ; деполяризация мембраны прямоугольным импульсом напряжения длительностью 4 минуты и амплитудой  $V_p = -50$  мВ. На вставке нормированная кривая зависимости амплитуды тока от концентрации дофамина. Б. Изменение потенциала покоя и сопротивления мембраны через 24 часа после инкубации в растворе с дофамином в концентрациях 0 - контроль, 0.1, 0.5, и 1 мМ. Приведены нормированные кривые. 1 –  $V_m$  потенциал покоя плазмалеммы, 2 –  $R_m$  сопротивление мембраны.

Кальциевые каналы L-типа управляются ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. Соответственно такое изменение состояния кальциевых каналов не может не отразиться на поведении  $\text{Ca}^{2+}$  зависимых хлорных каналов плазматической мембраны. Начальный этап роста концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме приводит к увеличению кальциевой проводимости за счет увеличения активности  $\text{Ca}^{2+}$  – и соответственно росту амплитуды тока  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых хлорных каналов и соответственно увеличению амплитуды тока [22,25]. Дальнейший рост концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме ведет к инактивации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и соответственно к уменьшению амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого хлорного тока.

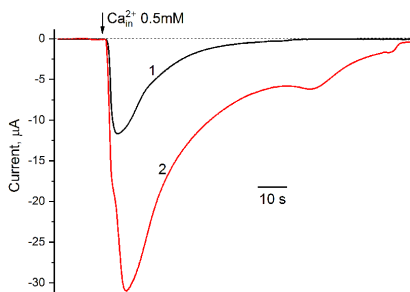
Помимо уменьшения амплитуды хлорной компоненты тока, наблюдается смещение пикового значения тока. При концентрации препарата 75 мкМ заметным становится процесс замедления кинетики развития тока, затягивается активация и инактивация переходного тока: Смещение пиковой амплитуды тока в зависимости от концентрации дофамина: 1 – контроль, 2 – 0.15 мМ, 3 – 0.5 мМ, 4 – 1.5 мМ. Б: Изменение вольтамперных характеристик Ca - и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{Cl}^-$  каналов в присутствии дофамина: 1 – контроль, 2 – 0.15 мМ дофамина, 3 – 7.5 мМ дофамина. Вольт-амперные характеристики построены по пиковым значениям амплитуды токов в зависимости от уровня фиксированного на мембране потенциала. Для разделения  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Cl}^-$ -компонент тока наружный раствор содержал 30 мМ NaCl. Вероятнее всего смещение максимума амплитуды тока указывает на снижение порога возбудимости мембраны. Можно предположить, что изменение порога мембранной возбудимости обусловлено ингибированием цАМФ – зависимого фосфорилирования субъединиц  $\text{Ca}^{2+}$ -канала [23]. В присутствии 1.75 мМ дофамина исчезала как кальциевая, так и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая хлорная компонента тока (рис. 2, кривая 4). Подобное ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого  $\text{Cl}^-$ -тока дофамином в концентрации 10 мкМ было обнаружено на эпителиальных клетках педальных ресничек *Tritonia diomedea* [24]. В нашем случае мы предположили, что ингибирующий эффект дофамина на хлорные каналы, возможно, связан с его конкурентным взаимодействием с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  за место связывания на рецепторе активации  $\text{Cl}^-$ -канала, располагающемся на внутренней стороне мембраны. Ранее, на плазмалемме клеток *Nitella syncarpa* [25], а также мембранах животных клеток [6, 26] было показано, что увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}_{\text{ins}}$  под влиянием инозитол-1,4,5-трифосфата приводило к активации  $\text{Cl}^-$ -каналов. Результат длительной, в течение 24 часов, инкубации клеток в растворе в присутствии дофамина в концентрации от 0 до 1 мМ показан на рисунке 1Б. В условиях *in vivo* он, проникая внутрь клеток, индуцирует появление сети актиновых филаментов в локусах, богатых глобулярным актином. Реорганизация актинового цитоскелета приводит к изменению морфофункционального статуса клеток.

Таким образом, полученные данные по взаимодействию нейромедиатора дофамина с возбудимой мембраной растительной клетки свидетельствуют о том, что характер этого взаимодействия очень схож с полученными результатами на клетках животных [1,5,27,28]. Связывание дофамина с рецепторами на клеточной мембране повышает в клетке уровень цАМФ, способствующий активации протеинкиназы А.



**Рис. 2.** Восстановление амплитуды интегрального тока плазмалеммы *Chara corallina* после удаления дофамина из омывающего клетку раствора: 1 – контроль, 2 – в присутствии 15 мМ дофамина, 3 – через 6 мин после отмывки клетки от дофамина

Результаты показывают, что дофамин действует на первую компоненту тока – кальциевые каналы, которая приводит к уменьшению амплитуды входящего кальциевого тока. Хлорные каналы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые [17], и что бы ответить на вопрос о влиянии дофамина на них проведены эксперименты на перфузируемых изнутри клетках с предварительно удаленным тонопластом. В этом случае возможно вводить ионы  $\text{Ca}^{2+}$  непосредственно в клетку с цитоплазматической стороны мембраны и непосредственно активировать хлорные каналы [22].



**Рис. 3.** Хлорный ток, полученный в ответ на введение в клетку 0.5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (кривая 1). Кривая 2. Хлорный ток вызванный  $\text{Ca}^{2+}$  при той же концентрации в присутствии 7.5 мМ дофамина снаружи клетки в рабочем отсеке камеры. N = 8.

Введение дофамина в перфузионный раствор изнутри клетки вместе с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  не влияло на характер развития хлорного тока. Эффект получен когда дофамин находится снаружи клетки, а активацию каналов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  вели изнутри, с цитоплазматической стороны мембраны.

Из результатов видно, что действие дофамина снаружи клетки на кальциевые и хлорные каналы имеет разнонаправленный характер. Увеличение концентрации дофамина вело к уменьшению кальциевого тока. Дофамин угнетал кальциевую проводимость. Взаимодействие дофамина с кальциевыми каналами было обратимым, отмывка от препарата вела к восстановлению интегрального тока. Хлорные каналы  $\text{Ca}^{2+}$  зависимые, поэтому в экспериментах на нативных клетках угнетение кальциевых каналов непременно вело к уменьшению амплитуды хлорной компоненты тока. Эксперименты на перфузируемых изнутри клетках, где  $\text{Ca}^{2+}$  вводится напрямую в клетку вместе с перфузатом, показали значительную зависимость амплитуды хлорного тока от присутствия дофамина снаружи клетки. Эффект увеличения тока достигал более 200%. Так как предыдущие эксперименты [22] показали что при концентрации  $\text{Ca}^{2+} = 0.1$  мМ активационная кривая выходит на плато, была выбрана концентрация превышающая в 5 раз. Поэтому такое значительное увеличение хлорного тока в присутствии дофамина нельзя объяснить увеличением числа активированных каналов. Вероятно присутствие дофамина снаружи клетки приводит к перераспределению времен жизни канала в открытом и закрытом состояниях в пользу открытого состояния.

В заключение следует сказать, что выяснение молекулярных механизмов действия биологически активных соединений, таких как дофамин, серотонин и другие вещества, объединяемые в общую группу под названием нейротрансмиттеры или нейромедиаторы, является одной из важнейших задач современной биологии. Дофамин и другие биогенные амины встречаются повсеместно, являясь универсальными агентами раздражимости в самых разных, эволюционно отдаленных систематических группах живых организмов, что позволяет объединить их под общим названием биомедиаторы. В частности, присутствие в растениях классических нейромедиаторов синаптической передачи возбуждения – ацетилхолина, катехоламинов, серотонина и гистамина, их заметная физиологическая активность, обнаружение компонентов холинергической и адренергической систем регуляции в растительных клетках, делает вполне реальной идею об универсальных принципах сигнализации и передачи информации в виде электрического и химического сигналов у всех живых организмов. Различия отмечаются, в основном, в частных механизмах межклеточной сигнализации у животных и растений, особенностями энергетического и метаболического обмена, их скоростью. Исследование механизма взаимодействия дофамина с ионными каналами возбудимой мембраны дает возможность подбирать

наиболее оптимальную модификацию лекарственных препаратов при лечении болезней, вызванных нарушением нормального синтеза и внутриклеточного обмена дофамина. Как известно, все лекарственные препараты при действии на клетку в первую очередь взаимодействуют с мембраной и ее структурными элементами – ионными каналами, рецепторами и липидным матриксом. В настоящее время, когда наркомания захлестнула значительную часть молодежи, борьба с этим недугом является для общества проблемой номер один. Это должно широко стимулировать исследования детальных механизмов взаимодействия нейромедиаторов с клетками и, в частности, с клеточной мембраной и ее структурными элементами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hoves O.D., Kapur S. // *Med. Schizophrenia Bull.* 2009. 35: 549-62.
2. Schifmann S. N., Desdouts F., Menu R. et al. // *Eur. J. Neurosci.* 1998. 10: 1312-20.
3. Dunnet S. B., Bentifoglio M., Bjurklund A., Hokfelt T. // *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Bjurklund A., Hokfelt T. (eds.). 21. Dopamine. Elsevier, Amsterdam. 2005.
4. Gorelova N.A., Yang Ch.R. // *J. Neurophysiology.* 2000. 84: 75-87.
5. Keababian J.W., Calne D.B. // *Nature.* 1979. 277: 93-6.
6. Mahan L.C., Burch R.M., Monsma F.J., Sibley D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. 87(6): 2196-200.
7. Missale C., Nash S.R., Robinson S.W. et al. // *Physiol Rev.* 1998. 78, 189-225.
8. Kitai S.T., Sumeier D.J. // *Adv. Neurol.* 1993. 60: 40-52.
9. Andersen P.H., Gingrich J.A., Bates M.D. et al. // *Trends Pharmacol Sci.* 1990. 11: 231-6.
10. Sunahara R.K., Guan H.C., O'Dowd B.F. et al. // *Nature.* 350: 614-9.
11. Van Tol H.H.M., Bunzow J. R., Guan H-C. et al. // *Nature.* 350: 610-4.
12. Tang L. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. 268: 495-502.
13. Nestler E.J., Malenka R.C. // *Sci. Am.* 2004. 890(3): 76-85.
14. Khoshbouli H., Sen N., Guptarou B. et al. // *PLoS Biol.* 2004. 2(3):E78.
15. Roshchina V.V. // *Neurotransmitters in Plant Life.* 2001. Enfield, Plymouth: Science Publ. 283.
16. Lunevsky V.Z., Zherelova O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. // *J. Membrane Biol.* 1983. 72: 43-58.
17. Берестовский Г.Н., Жерелова О.М., Катаев А.А. // *Биофизика.* 1987. 32(6): 1011-27.
18. Hedrich R., Jeromin A. // *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 1992. 338(1283): 31-8.
19. Schreder J, Thuleau P. // *Plant Cell.* 1991. 3: 555-9.
20. Жерелова О. М., Белевич Г. В., Берестовский Г.Н., Дубур Г.Я. // *Биол. Мембраны.* 1990. 7(1): 36-40.
21. Zherelova O.M. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. 96A: 173-6.
22. Kataev A.A., Zherelova O.M., Berestovsky G.N. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1984. 3: 447-62.
23. Surmeier D.J., Bargas J., Hemmings H.C. et al. // *Neuron.* 1995. 14: 385-97.



24. Woodward O.M., Willows A.O.D. // J. Exp. Biol. 2006. 209: 2749-64.
25. Zherelova O.M. // FEBS Lett. 1989. 249: 105-7.
26. Undie A.S., Weinstock J., Sarau H.M., Friedman E. // J. Neurochem. 1994. 62: 2045-8.
27. Barnes S., Syed N.I., Bulloch A.G.M., Lukowiak K. // J. Exp. Biol. 1994. 189: 37-54.
28. Cantrell A.R., Smith R.D., Goldin A.L. et al. // Neuroscience. 1997. 17(19): 7330-8.
29. Мошков Д.А., Павлик Л.Л., Шубина В.С. и др. // Биофизика. 2010. 55(5): 855-6.

## СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ МЕТФОРМИНА И АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА У САМЦОВ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, ВЫЗВАННЫМ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ

*Лебедев И.А., Деркач К.В., Бахтюков А.А., Фокина Е.А., Шпаков А.О.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** В условиях метаболических расстройств, таких как ожирение, метаболический синдром (МС) и сахарный диабет 2 типа, нарушаются функции репродуктивной системы как у мужчин, так и у женщин, что может приводить к бесплодию. В связи с этим актуальной задачей является поиск путей для коррекции этих нарушений. Здесь могут быть использованы два подхода. Первый из них включает применение препаратов, улучшающих метаболический статус, нормализующих глюкозный гомеостаз и инсулиновую чувствительность, в то время как второй предполагает применение активаторов стероидогенеза, в том числе гонадотропинов с активностью агонистов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР). Однако механизмы и мишени действия этих препаратов на синтез половых стероидных гормонов при МС, вызванном длительной высокожировой диетой, изучены недостаточно, и это не позволяет разработать оптимальные схемы их применения для нормализации стероидогенной функции. Целью работы было изучить эффекты совместного и раздельного введения метформина (МФ), широко используемого антидиабетического препарата, и агонистов ЛГР – хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и тиенопиримидинового производного ТПОЗ, различающихся по механизмам действия, на тестикулярный стероидогенез и уровень тестостерона в крови самцов крыс с МС, вызванным высокожировой диетой. Необходимо отметить, что ХГЧ с высоким родством связывается с внеклеточным доменом ЛГР, где локализован ортостерический сайт, в то время как ТПОЗ взаимодействует с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном домене ЛГР. Как было показано нами ранее [1,2], оба агониста ЛГР стимулируют

тестикулярный стероидогенез в норме и при метаболических расстройствах. Выбор МФ обусловлен не только тем, что он улучшает метаболический и гормональный статус при МС, но и его способностью положительно влиять на различные звенья гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [3,4].

**Методика.** МС вызывали переводом двухмесячных самцов крыс Wistar на высокожировую диету [5]. Крысы в течение 23 недель получали по 5-7 г высокожировой смеси в сутки, дополнительно к стандартному рациону. Контрольная группа получала гранулированный сухой корм. На основании результатов глюкозотолерантного теста отбирали крыс с повышенным содержанием глюкозы в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки (выше 7.2 мМ), а также с повышенной массой тела, рассматривая их как животных с развившимся МС. После этого рандомизировали крыс на экспериментальные группы. Группа МФ в течение 5 недель получала МФ (120 мг/кг/сутки, перорально) и продолжала получать пищу с высоким содержанием насыщенных жиров. Группа МС вместо МФ получала плацебо. За неделю до окончания лечения МФ проводили повторный глюкозотолерантный тест для оценки метаболического и гормонального статуса животных, исследуя уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски «One-Touch Select Ultra» (США), для определения концентрации инсулина и лептина – наборы «Rat Insulin ELISA» (Mercodia AB, Швеция) и «ELISA Kit for Leptin» (Cloud-Clone Corp., США).

Затем группы МС и МФ случайным образом делили на 3 подгруппы каждую (по 6 крыс): МС (без лечения), МСМ (МФ, 120 мг/кг/сутки, перорально), МСТ (ТП03, 15 мг/кг/сутки, внутривенно, 5 дней), МСГ (ХГЧ, 20 МЕ/крысу/сутки, подкожно, 5 дней), МСМТ (совместно МФ и ТП03), МСМГ (совместно МФ и ХГЧ). Также исследовали контрольные группы – без обработки (К) и с обработкой ТП03 и ХГЧ (КТ, КГ). В ходе эксперимента оценивали концентрацию тестостерона в крови животных, которую определяли с помощью набора «Тестостерон-ИФА» (Алкор-Био, Россия). После забоя крыс в конце эксперимента забирали ткани семенников для оценки экспрессии целевых генов, оценивали массу жировой ткани и ее долю в общей массе тела. Все процедуры осуществляли, следуя требованиям Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени из семенников выделяли тотальную РНК, используя «ExtraRNA» реагент (Evrogen, Россия). Обратную транскрипцию проводили, используя набор «MMLV RT Kit» (Evrogen, Россия). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора «7500 Real-Time PCR System» (Thermo Fisher Scientific Inc., США). В качестве референсных использовали гены

18S-pPHK (*18S rRNA*) и  $\beta$ -актина (*Actb*). Анализ результатов проводили с использованием метода  $\Delta\Delta C_t$ . Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ «SPSS Statistics», используя однофакторный дисперсионный анализ с попарным сравнением с помощью апостериорного критерия Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** У крыс с MC отмечали все основные признаки заболевания – повышенную массу тела и абдоминального жира, гипергликемию, нарушенную толерантность к глюкозе, повышенные уровни инсулина и лептина, как базовые, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки. Наряду с этим, в крови животных отмечали снижение уровня тестостерона, а в семенниках снижение экспрессии гена холестерина-транспортирующего белка StAR, катализирующего скорость-лимитирующую стадию тестикулярного стероидогенеза (табл. 1, 2). При этом экспрессия генов, кодирующих цитохромы CYP11A1 и CYP17A1, катализирующие превращение холестерина в прегненолон (CYP11A1) и прогестерона в 17-оксипрогестерон и андростендион (CYP17A1), а также ЛГР в группе MC существенно не менялась (табл. 2). Стимулирующие эффекты ТПО3 и ХГЧ на уровень тестостерона в крови при обработке ими контрольных крыс были значимо выше, чем таковые в группах с MC (данные не представлены). Эти данные свидетельствуют в пользу развития андрогенной недостаточности у MC-крыс, снижения их стероидогенного ответа на ЛГР-агонисты, а также ослабления экспрессии белка StAR, начального звена тестикулярного стероидогенеза, и согласуются с данными литературы об ослаблении продукции тестостерона при различных формах MC и ожирения [6,7].

**Табл. 1.** Уровни тестостерона в крови при пятидневном введении ТПО3 (15 мг/кг/сутки, в/б) и ХГЧ (20 МЕ/крысу/сутки, п/к) самцам крыс с диетиндуцированным MC с пятидневным лечением метформинем (120 мг/кг/сутки, перорально) и без такового.

Группа крыс	До	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день
К	7.2±0.3	8.7±0.4	7.3±0.4	8.6±0.7	10.1±0.3	9.1±0.6
MC	4.4±0.3*	5.2±0.4*	5.9±0.6	6.6±0.7	5.5±0.4*	5.9±0.4*
MCM	6.1±0.6	7.9±0.4#	6.8±0.4	7.5±0.5	8.0±0.2*#	8.8±0.5#
MCT	4.8±0.5*	22.4±2.8*#	28.2±3.0*#	29.2±2.5*#	26.2±2.1*#	31.3±3.2*#
MCTM	6.4±0.8	21.5±1.1*#	19.7±1.9*#	28.2±2.9*#	27.9±3.1*#	25.5±2.3*#
MCTG	4.9±0.8	58.9±4.2*#	39.1±3.7*#	31.7±3.8*#	37.8±4.6*#	40.7±3.1*#
MCTMG	6.3±0.8	51.4±3.4*#	54.3±6.0*#	52.2±4.3*#@	60.9±5.1*#@	54.2±3.8*#

**Примечание:** данные представлены как среднее  $\pm$  SEM (во всех группах n = 6).  
 \* – различия по сравнению с группой К статистически значимы при  $p < 0.05$ ;  
 # – различия по сравнению с группой MC статистически значимы при  $p < 0.05$ ;  
 @ – различия между группами MCTG и MCTMG статистически значимы при  $p < 0.05$ .

Лечение крыс МФ приводило к снижению массы тела и жировой ткани, частичному восстановлению толерантности к глюкозе, ослаблению гипергликемии, снижению базовых и стимулированных глюкозой уровней инсулина и лептина, что свидетельствует об улучшении углеводного обмена и повышении чувствительности тканей к инсулину и лептину, что согласуется с эффектами МФ на метаболические и гормональные показатели при лечении МС в клинике и у экспериментальных животных [8]. МФ также повышал уровень тестостерона в крови до такового у контрольных самцов крыс, хотя при этом существенно не влиял на экспрессию гена *Star* в семенниках (табл. 1, 2). Это свидетельствует о нормализующем эффекте МФ терапии на андрогенный статус, ослабленный при МС.

**Табл. 2.** Влияние пятидневной метформиновой терапии и пятидневного введения ТПОЗ и ХГЧ на экспрессию генов, кодирующих стероидогенные белки и ЛГР, в семенниках крыс с диета-индуцированным МС.

Группа крыс	<i>Star</i>	<i>Cyp11A1</i>	<i>Cyp17A1</i>	<i>Lhr</i>
К	1.00±0.06	1.03±0.12	1.02±0.06	1.03±0.10
МС	0.58±0.05*	0.75±0.10	0.98±0.09	0.90±0.08
МСМ	0.69±0.11	0.86±0.11	1.35±0.22	1.16±0.09
МСТ	2.18±0.26*#	1.09±0.20	1.14±0.06	0.91±0.05
МСМТ	1.95±0.18*#	1.59±0.14#	1.86±0.11*#@	1.35±0.18
МСГ	1.62±0.25#	2.53±0.39*#	2.49±0.23*#	0.18±0.03*#
МСМГ	1.88±0.16*#	3.42±0.44*#	3.31±0.56*#	0.23±0.02*#

**Примечание:** данные представлены как среднее ± SEM (во всех группах n = 6).  
 \* – различия по сравнению с группой К статистически значимы при  $p < 0.05$ ;  
 # – различия по сравнению с группой МС статистически значимы при  $p < 0.05$ ;  
 @ – различия между группами МСТ и МСМТ статистически значимы при  $p < 0.05$ .

На протяжении всех пяти дней обработки крыс с помощью ТПОЗ и ХГЧ отмечали повышение уровня тестостерона как у МС-крыс с обработкой МФ, так и без таковой (табл. 1). При этом значимых различий в уровне тестостерона между группами МСТ и МСМТ выявлено не было, а между группами МСГ и МСМГ значимые различия отмечались только на 3-й и 4-й дни обработки. Это указывает на отсутствие значимого влияния МФ на эффекты аллостерического ЛГР-агониста, и на сравнительно небольшое усиливающее влияние МФ на стимулирующие тестикулярный стероидогенез эффекты гонадотропина. Оценка экспрессии тестикулярных генов показала некоторое усиление стимулирующего эффекта ЛГР-агонистов на экспрессию обоих цитохромов в группах с лечением МФ, причем в случае ТПОЗ различия между группой МСМТ были значимыми в сравнении с группами МС (*Cyp11A1*, *Cyp17A1*), МСТ (*Cyp17A1*) и контролем (*Cyp17A1*), но не выявила существенных изменений в уровне экспрессии гена *Star* (табл. 2). Экспрессия гена, кодирующего ЛГР, слабо менялась в группах с

обработкой ТП03, в том числе совместно с МФ, но в значительной степени снижалась в группах с обработкой ХГЧ, что является компенсаторной реакцией на пятидневную ХГЧ-индуцированную гиперстимуляцию ЛГР (табл. 2).

Таким образом, несмотря на восстанавливающий эффект МФ на базовый уровень тестостерона у крыс с диета-индуцированным МС, терапия этим антидиабетическим препаратом не вносила существенного вклада в стероидогенные эффекты аллостерического ЛГР-агониста (ТП03) и в небольшой степени усиливала соответствующие эффекты ортостерического ЛГР-агониста (ХГЧ). Это позволяет сделать вывод о том, что совместное применение МФ и ЛГР-агонистов в условиях андрогенной недостаточности не приводит к значимому потенцированию стероидогенных эффектов ЛГР-агонистов, по крайней мере, при исследуемых дозах и выбранном дизайне эксперимента. Ранее нами было показано, что у самцов крыс с тяжелой декомпенсированной формой сахарного диабета 2 типа МФ терапия усиливает стероидогенные эффекты аллостерического и ортостерического агонистов ЛГР при их однократном введении, но при длительном (3 дня и более) введении потенцирующий эффект МФ на стероидогенные эффекты затухал [2]. Интересен тот факт, что в настоящем исследовании при однократном введении ТП03 и ХГЧ крысам с МС потенцирующий эффект МФ терапии нами выявлен не был. Тем самым, убедительных свидетельств в пользу целесообразности совместного применения МФ и ЛГР-агонистов для компенсации андрогенного дефицита при метаболических расстройствах получено не было, несмотря на то что восстанавливающий эффект МФ монотерапии на стероидогенную функцию семенников при МС не вызывает сомнений.

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-75-20122).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21: 7493.*
2. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 23: 198.*
3. *Shpakov A.O. // Pharmaceuticals (Basel). 2021. 14: e42.*
4. *Tseng C.H. // World J. Mens Health. 2022. 40: 11-29.*
5. *Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L. et al. // Neurochem. Res. 2018. 43(4): 821-37.*
6. *Louters M., Pearlman M., Solsrud E., Pearlman A. // Int. J. Impot. Res. 2022. 34: 714-20.*
7. *Hermoso D.A.M., Bizerra P.F.V., Constantin R.P. et al. // Aging Male. 2020. 23: 1296-315.*
8. *Du Y., Zhu Y.J., Zhou Y.X. et al. // Mol. Biomed. 2022. 3: 41.*

# ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Новожилов А.В.<sup>1</sup>, Хабиб С.<sup>2</sup>, Ганем А.<sup>1,2</sup>, Воронина П.А.<sup>1</sup>,  
Корф Е.А.<sup>1</sup>, Гончаров Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Пероксид водорода (ПВ) – один из видов активных форм кислорода (АФК). АФК долгое время рассматривали как побочные продукты аэробного дыхания, вызывающие оксидативный стресс [1]. Однако в последнее время накопилось много данных о том, что ПВ выполняет многочисленные сигнальные функции в клетке. Обусловлено это рядом причин, среди которых – относительно долгое время существования в клетке по сравнению с другими АФК (до 1 мс), способность проникать через мембранные структуры и перемещаться в цитозоле на значительные расстояния (до 1 мкм), низкая реакционная способность в отношении биологических молекул [2]. Ферментативная генерация и деградация ПВ, наряду с его способностью к окислению тиолов, дает специфичность места и времени, которые необходимы для передачи сигналов [3]. Сигнальная функция ПВ хорошо исследована на клеточных культурах [4], а в экспериментах *in vivo* ПВ обычно используют в моделях оксидативного стресса [5]. До недавнего времени полагали, что внутриклеточная концентрация пероксида водорода при экзогенном введении в 7-10 раз ниже, чем снаружи клетки [3]. Однако, по данным авторов [6], это соотношение может составлять до 650, на основании чего некоторые работы по изучению влияния экзогенного ПВ на биологические объекты можно рассматривать как работы по исследованию его сигнальной функции [7]. Цель данного исследования - изучить краткосрочные эффекты однократно вводимого ПВ на биохимические показатели эритроцитов крыс.

**Материал и методы.** Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Объектом исследования служили аутбредные самцы крыс линии Wistar 3-месячного возраста, массой 240-280 г. Крыс содержали в стандартных условиях вивария с режимом светового дня 12:12, за 12 часов до

эксперимента животные были лишены пищи, но не воды. В эксперименте было 3 группы крыс: контроль ( $n = 13$ ), 5 минут ( $n = 14$ ) и 20 минут ( $n = 15$ ) после введения ПВ. Водный раствор ПВ 15 мг/мл вводили внутривенно в объеме 5 мл/кг, т.е. доза составила 75 мг/кг. Крыс умерщвляли декапитацией с помощью гильотины через 5 и 20 мин. Кровь собирали в пробирки, содержавшие гепарин, до конечной концентрации гепарина 50 МЕ/мл. Для получения плазмы и эритроцитарной массы кровь откручивали 4 мин при 1700 g. Верхний слой, содержащий лейкоциты и тромбоциты, убирали с помощью дозатора, эритроцитарную массу промывали дважды 3-кратным объемом охлажденного физиологического раствора, осаждая клетки при 1000 g в течение 3 мин. Эритроциты аликвотировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения измерений. Определяли активность или концентрацию следующих показателей: глутатионредуктаза (ГР), глутатионпероксидаза I типа (ГП1), глутатион S-трансфераза (ГТ), восстановленный и окисленный глутатион (ВГ и ОГ соответственно),  $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ -супероксиддисмутаза I (СОД1), карбоангидраза (КА), S-формилглутатион гидролаза (ФГГ), каталаза (Кат), пируват, лактат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), метгемоглобин (метHb),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза,  $\text{Mg}^{2+}$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, пероксиредоксин 2 (ПР2), ТБК-реагирующие продукты. Обработка результатов была проведена с использованием непараметрического критерия Крускала-Уоллиса для сравнения нескольких независимых выборок. Парное сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные выражали в виде медианы и ошибки медианы.

**Результаты.** Результаты приведены в таблице 1. На фоне введения ПВ не отмечалось изменения активности СОД1 и Кат, однако выявлено снижение активности ПР2 на 21% через 5 мин. К 20-й мин происходит восстановление ПР2, не достигающее уровня контроля. Концентрация ВГ не только не снизилась, но даже возросла через 20 мин на 7%, что сопряжено с повышением активности ГП1 на 7% через 20 мин и ГТ на 22% уже через 5 мин. При этом достоверных отличий в активности ГР и Г6ФДГ не выявлено. Исследование активности АТФаз показало снижение на 25% активности уабаин чувствительной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы через 5 мин и тенденцию к восстановлению через 20 мин ( $-15.5\%$ ). Динамика активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы была менее выражена: снижение на 11% через 5 мин и полное восстановление через 20 мин. Активность  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы при этом неуклонно возрастала на 19% и 27% через 5 и 20 мин соответственно. Оценивая динамику ферментативной активности и концентраций продуктов гликолиза, отметим увеличение активности ЛДГ на 12% и концентрации лактата на 30% через 5 мин после введения ПВ. К

20-й минуте воздействия ПВ данные показатели восстанавливались, не достигая уровня контроля. Концентрация пирувата при этом имела тенденцию к росту на 25-37% через 5 и 20 мин. Введенный ПВ через 5 мин привел к небольшому, но статистически значимому росту активности КА на 8 и 10% через 5 и 20 мин соответственно. Активность ФГГ при этом оставалась на исходном уровне. Оценивая уровень окислительного повреждения эритроцитов, следует отметить значительное повреждение липидов мембран: уровень ТБК-активных продуктов возрос уже через 5 мин на 24%, оставаясь на этом уровне через 20 мин. В то же время уровень метгемоглобина не претерпел изменений после введения ПВ.

**Табл. 1.** Биохимические показатели эритроцитов крыс после введения перекиси водорода.

N	показатель	Контроль	5 мин	20 мин
1	ГР, нмоль GSH/мин×г Hb	388±78	428±81	378±65
2	ГП1, мкмольGSH /мин×гHb	383±6	398±18	411±23*
3	ГТ, мкмоль сопj GSH/мин×гHb	1.36±0.24	1.66±0.30*	1.64±0.15*
4	ВГ, мкмоль/г Hb	6.51±0.29	6.90±0.60	7.00±0.14*
5	ОГ, мкмоль/г Hb	1.78±0.14	1.67±0.44	1.49±0.50
6	СОД1, у.е./мин×гHb	110±2	109±10	106±15
7	КА, ммоль НФА/мин×гHb	4.05±0.39	4.38±0.51*	4.45±0.38*
8	ФГГ, ммоль НФА/мин×гHb	2.88±0.25	2.83±0.63	2.65±0.78
9	Кат, ммоль/мин×гHb	124±7	118±5	125±6
10	Пируват, мкмоль/г Hb	0.65±0.08	0.89±0.16	0.81±0.11
11	Лактат, мкмоль/г Hb	61±7	79±5*	70±9
12	Г6ФДГ, мкмоль NADP/мин×гHb	9.79±0.64	9.59±0.45	9.24±0.49
13	ЛДГ, мкмоль NADH/мин×гHb	21.1±1.1	23.7±2.6*	22.0±1.7
14	МетHb, %/г Hb	0.31±0.02	0.33±0.01	0.30±0.02
15	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФ-аза, мкмольP <sub>i</sub> /г Hb/ч	47±6	35±12*	39±7*
16	Mg <sup>2+</sup> -АТФ-аза, мкмольP <sub>i</sub> /г Hb/ч	91±10	109±16*	116±11*
17	Ca <sup>2+</sup> -АТФ-аза, мкмольP <sub>i</sub> /гHb/ч	67±3	59±5*	67±5
18	ПР2, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин×гHb	16.8±1.0	13.3±1.0*	14.8±1.0
19	MDA, нмоль/г Hb	451±40	560±64*	565±44*

Достоверность отличий посчитана с помощью критерия Манна-Уитни.  
\* – p < 0.05 – отличия от контрольной группы.

**Обсуждение результатов.** Проникая в клетки по аквапоринам, ПВ может окислять мембранные белки. Однако деструктивные последствия в клетке обуславливаются главным образом гидроксильным радикалом, на что указывает возрастание уровня ТБК-активных продуктов в эритроцитах. Снижение активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы можно объяснить окислением липидного окружения, а также окислительным повреждением протомеров фермента с утратой способности к взаимодействию [8].



Снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы обуславливает накопление ионов натрия, что, в свою очередь, может стимулировать  $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ -обменник [9] либо  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [10].  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза также является чувствительной к липидному окружению [11], ее активность предотвращает развитие эриптоза, запускаемого кальций-опосредованными белками [12]. Так как активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы снижается через 5 мин и восстанавливается через 20 мин после введения ПВ, решающую роль в снижении ее активности играет, скорее всего, обратимое тиоловое окисление. В связи с тем что уровень ВГ возрастал через 5 мин и оставался повышенным через 20 мин, восстановление активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы могло быть обусловлено работой системы восстановленного глутатиона. Однако снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз через 5 мин очевидно привело к активации  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных протеаз, липаз и скрамблазы, участвующих в разрушении мембранных компонентов [13]. В качестве компенсаторного механизма можно рассматривать вход ионов магния через  $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ -обменник, а также посредством  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, активность которой повышена через 5 и 20 мин. Так как ионы  $\text{Mg}^{2+}$  способны конкурировать с  $\text{Ca}^{2+}$  в местах связывания, они могут выступать в роли мембрано- и цитопротектора. Кроме того, ионы магния модулируют активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [14]. В связи с тем, что концентрация ОГ имела тенденцию к снижению, можно предположить, что увеличение концентрации ионов  $\text{Mg}^{2+}$  могло стимулировать активный транспорт ОГ из клетки с помощью ОГ-стимулируемой  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы [15]. Активность ГбФДГ и ГР не изменилась после введения ПВ, что указывает на соответствующую требованиям клетки поставку восстановительного субстрата в форме НАДФН. На фоне увеличения концентрации ВГ выявлен рост активности ГП1, функция которой – восстановление ПВ и гидроперекисей липидов. Также отмечался значительный рост активности ГТ, способной восстанавливать гидроперекиси липидов [16]. Кроме этого ГТ также выполняет сигнальную функцию, основанную на способности восстанавливать глутаредоксин [17]. Возрастание концентрации ВГ и активности ГТ сопровождается S-глутатионилированием белков, меняющим их функциональное состояние и предотвращающим их дальнейшее необратимое окисление [18]. Увеличение активности карбоангидразы, наблюдаемое через 5 и 20 минут стимулирует образование  $\text{HCO}_3^-$ , в присутствии этого иона СОД1 способна нейтрализовать ПВ с образованием пероксокарбоната [19]. В восстановлении ПВ принимает также участие ПР2, активность которого снижена через 5 мин после воздействия ПВ. По-видимому, этот фермент взял на себя основную функцию по нейтрализации ПВ за счет своих тиоловых групп, тем самым сохранив пул ВГ [20]. Пероксиредоксины

подвергаясь обратимому ингибированию в клетке, восстанавливаются в паре с тиоредоксином (ТР) [21]. Активность ЛДГ и концентрация лактата были увеличены через 5 мин, при этом отмечалась тенденция к повышению уровня пирувата. Активация анаэробного гликолиза в эритроцитах обеспечивает, с одной стороны, увеличение производства АТФ, с другой стороны – генерацию НАДН для метгемоглобин-редуктазного пути, о чем свидетельствует неизменная концентрация метНб.

Таким образом, вводимый экзогенно ПВ обуславливает развитие оксидативного стресса в эритроцитах, влияя на перекисное окисление липидов, активность мембранных АТФаз, баланс ионов кальция, систему глутатиона и ПР2/ТР. Эффект от введенного ПВ развивался уже к 5-й минуте, через 20 мин происходило восстановление некоторых показателей. Представленная модель может быть использована при разработке средств антиоксидантной защиты организма и как компонент более сложных моделей, связанных с развитием ОРД-синдрома в условиях гипоксии, нормо- и гипербарической оксигенации.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. // Биомед. Хим. 2007. 53(4): 351-72.
2. Lim J.B. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2015. 89: 47-53.
3. Ткачук В.А. и др. // Биол. Мембр. 2012. 29(1-2): 21-37.
4. Stone J.R., Collins T. // Endothelium. 2002. 9(4): 231-8.
5. Ganie S.A. et al. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2011. 15(8): 906-15.
6. Huang B.K., Sikes H.D. // Redox. Biol. 2014. 2: 955-62.
7. Mishina N.M. et al. // Antioxid & Redox Signal. 2011. 14(1): 1-7.
8. Wang Y. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2014. 71: 415-26.
9. Günther T., Vormann J. // Biochem. Biophys. Acta. Biomembr. 1995. 1234(1): 105-10.
10. Matchkov V.V. et al. // Circ. Res. 2007. 100(7): 1026-35.
11. Su Z. et al. // Acta. Pharmacol. Sinica. 1993. 14(5): 393-6.
12. Ващенко В.И., Вильянинов В.Н. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2019. 17(3): 5-38.
13. Bigdelou P., Farnoud A.M. // J. Vis. Exp. 2020. 21(155): 10.3791/60659.
14. Apell H.J., Hitzler T., Schreiber G. // Biochem. 2017. 56(7): 1005-16.
15. Kondo T. et al. // PNAS. 1987. 84(21): 7373-7.
16. Prabhu K.S. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. 424(1):72-80.
17. Deponte M. // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2013. 1830(5): 3217-66.
18. Jacob C. et al. // Chem. Res. Toxicol. 2012. 25(3): 588-604.
19. Liochev S.I., Fridovich I. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. 421(2): 255-9.
20. Carvalho L.A.C. et al. // J. Biol. Chem. 2017. 292(21): 8705-15.
21. Chae H.Z., Chung S.J., Rhee S.G. // J. Biol. Chem. 1994. 269(44): 27670-8.

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА БАЛАНС  
МЕТАБОЛИТОВ NO, ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА  
И ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА АСЦИТНОЙ ГЕПАТОМЫ  
ЗАЙДЕЛЯ В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ КРЫСЫ

*Поцелуева М.М.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия

**Введение.** Факт образования в организме опухоли означает неэффективность работы специфических механизмов отслеживания и уничтожения трансформированных клеток. Следовательно, возрастает роль неспецифических механизмов защиты организма [1,2], которая до конца неясна. Рост опухоли сопровождается распространением сигналов, которые активируют компоненты врожденного иммунитета, клеточной составляющей которого, помимо натуральных киллерных клеток, являются полиморфноядерные лейкоциты (в основном, это нейтрофилы и моноциты), а также тканевые макрофаги. Активация данного типа клеток, относящихся к фагоцитам, сопровождается продукцией активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА). Бактерицидное и цитотоксическое действие NO и АФК во многом зависит от продуктов их взаимодействия [3]. Возникающие в таких реакциях активные метаболиты – пероксинитрит, диоксид азота, нитрозоамины и др. обладают высокой реакционной способностью и могут повреждать различные клеточные структуры, изменяя их функциональную активность. Изменение состава продуцируемых организмом АФК и (АФА) могут выразиться в качественных изменениях поведения системы в целом и оказаться токсичным к опухолевому росту. Группа авторов [4] на экспериментальной модели опухоли (асцитная гепатома Зайделя) показали динамику спектра форменных элементов крови, потенциальную АФК-генерирующую активность фагоцитов и снижение антиоксидантной емкости плазмы опухоленосителя. На той же модели [5] было исследовано влияние субстрата, донора и ингибитора NO на продукцию метаболитов оксида азота, на концентрацию и АФК-генерирующую активность иммунокомпетентных клеток. Показано позитивное влияние донора NO (SNP) на снижение концентрации опухолевых клеток, но, к сожалению, уже в необратимой фазе роста опухоли. В связи с выше сказанным актуальным является исследование взаимовлияния нитрозилирующего и окислительного стрессов на интенсивность опухолевого роста. С этой целью нарушенный баланс между этими и про- и антиоксидантными системами предлагается регулировать соединениями полифенольной природы, в частности, флавоноидами, обладающими как

антиоксидантной, так и противоопухолевой активностью [6,7]. В качестве регулятора уровня окислительного стресса избран дигидрокверцетин (ДГК). Будет исследовано модулирующее действие флавоноида дигидрокверцетина (таксифолина) на уровень метаболитов NO, показатели окислительного стресса в плазме и асцитической жидкости крысы с развивающейся в брюшной полости асцитной гепатомой Зайделя.

**Материалы и методы.** Объект исследования. В качестве объекта исследования была использована перевиваемая асцитная гепатома Зайделя (АГЗ). В экспериментах использовали крыс-самцов породы Вистар весом 200-220 г. Выделение макрофагов осуществляли из декапитированного животного, вводя в брюшную полость стерильный физраствор из расчета 1 мл на 10 г. веса животного. Экссудат собирали и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок в среде RPMI-1640. Асцитную жидкость для выделения макрофагов собирали из брюшной полости декапитированного животного, центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток промывали солевым раствором. Затем клетки наслаивали на градиент Percoll-NaCl с плотностями 1.04, 1.056, 1.078 и 1.116 и центрифугировали в течение 45 мин при 1600 g. Макрофаги распределялись на границе плотностей 1.056-1.078. Фракцию лейкоцитов получали путем осаждения клеток методом дифференциального центрифугирования в течение 10 мин при 400 g после лизиса эритроцитов хлористым аммонием (0.87%). Затем клетки наслаивали на градиент плотности Percoll-NaCl и центрифугировали в течение 45 мин при 1600 g. В зоне плотности 1.112 была отобрана фракция ПМЯЛ.

Концентрацию NO в плазме крови измеряли по концентрации нитритов, являющихся конечным продуктом метаболизма короткоживущего соединения NO. Количество нитритов в супернатантах измеряли с использованием реактива Грисса. Затем измеряли оптическую плотность при длине волны – 546 нм. Калибровочная кривая была построена с использованием стандартных растворов нитрита натрия NaNO<sub>2</sub>.

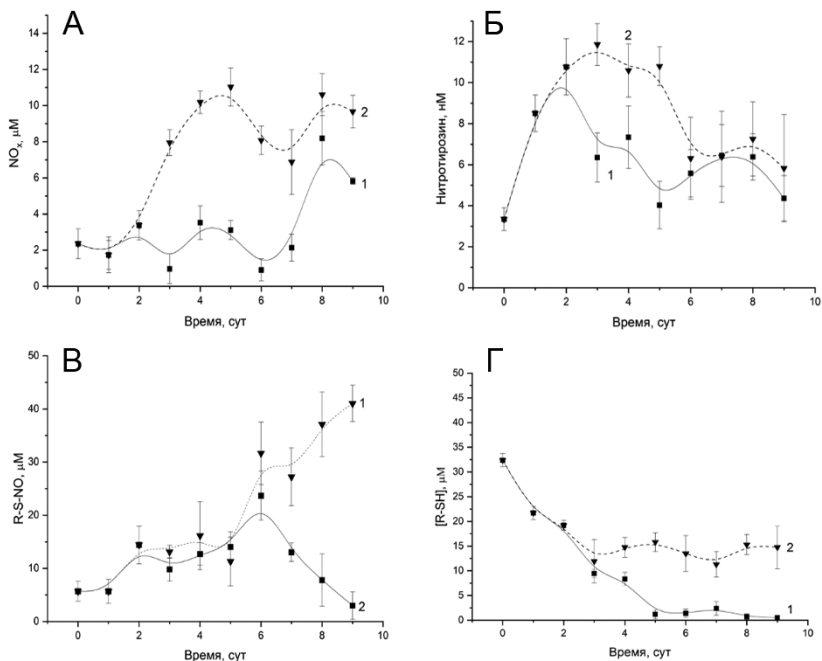
Измерение концентрации S-нитрозотиолов в асцитной жидкости и плазме крови. Метод основан на спектрофотометрическом измерении нитрита, образующегося при добавлении Hg<sup>2+</sup>, который, действуя как специфический разрушитель S-N связи, катализирует высвобождение из S-нитрозилированных тиолов оксида азота. Последний, окисляясь до NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, определяется с помощью реактива Грисса при 540 нм. Калибровочная кривая была построена с использованием стандартных растворов нитрита натрия. Концентрацию нитрозотиолов определяли, как разность концентраций нитритов в образцах, обработанных и необработанных HgCl<sub>2</sub>. Концентрацию нитротирозина определяли иммуноферментным методом с помощью набора фирмы «НВТ» (Нидерланды).

Измерение концентрации тиоловых групп белков. К плазме крови или асцитной жидкости добавляли раствор ДТНБ (0.025 г/л), 30 минут инкубировали в темноте при комнатной температуре, затем измеряли оптическую плотность проб при  $\lambda = 412$  нм. Расчёт концентрации тиоловых групп производили с учётом коэффициента молярной экстинкции ( $13 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ).

Статистическая обработка данных. Обработку полученных результатов проводили с использованием программ MS «Excel» и «Origin 8.0». Из совокупности данных рассчитывали среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента для малых выборок ( $n \leq 30$ ).

**Результаты и обсуждение.** Известно, что при развитии асцитной гепатомы Зайделя в организме нарушается баланс между окислительной и антиоксидантной системами. В крови развивается окислительный стресс, а зоне роста опухоли, наоборот, создаются восстановительные условия, характеризующиеся низким уровнем АФК, высокой концентрацией белковых SH-групп, гипоксией, ацидозом, что не противодействует росту опухоли. В качестве эффективного и хорошо изученного флавоноида был выбран дигидрокверцетин. Он участвует в регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в нейтрофилах, ингибирует метаболизм арахидоновой кислоты и процесс дегрануляции тучных клеток. На основании этих данных была поставлена задача: изучить действие ДГК на развитие нитрозилирующего стресса при развитии гепатомы Зайделя.

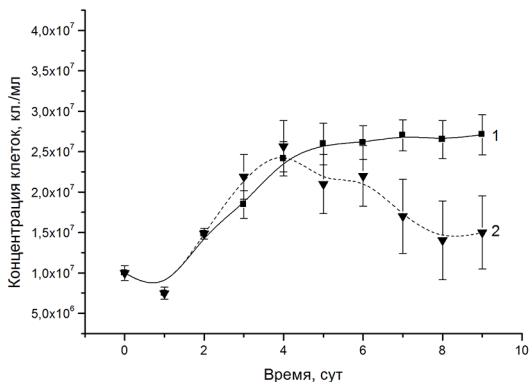
Установлено, что при ежесуточной инъекции ДГК в брюшную полость опухоленосителя в асцитной жидкости не обнаружено изменений в концентрации нитритов/нитратов по сравнению с обычным развитием опухоли. Однако в этих условиях отмечено увеличение содержания белков, модифицированных активными формами азота. Данный эффект может быть обусловлен тем, что при введении соединения с антиоксидантными свойствами происходит снижение окислительной модификации белков, которая выражена в повышении уровня белковых SH-групп. Необходимо отметить, что изменения в концентрации производных оксида азота могут быть также связаны с их транспортом из плазмы в асцит. В плазме крови опухоленосителя при введении ДГК отмечено значительное увеличение концентрации всех исследуемых метаболитов оксида азота (рис. 1). Зафиксирован рост концентрации низкомолекулярных нитратов/нитритов (3-4 раза) (рис. 1А), что свидетельствует о росте продукции NO в организме, либо об ухудшении процесса выведения нитратов. Так значительно (в 2-3 раза) возросла концентрация нитротирозина (рис. 1Б) в середине опухолевого роста, что, по-видимому, связано с уменьшением модификации тирозина активными формами кислорода.



**Рис. 1.** Динамика различных метаболитов оксида азота и R-SH в плазме крови при развитии асцитной гепатомы Зайделя при ежесуточном введении ДГК 1 мг/кг. кривая 1-контрольныеопухоленосители; кривая 2-инъекции ДГК. А) динамика NO<sub>x</sub>; Б) динамика нитротирозина; В) динамика R-S-NO; Г) Изменение концентрации R-SH в ходе развития опухоли в плазме крови при инъекции ДГК. кривая 1 – контрольные опухоленосители; кривая 2 – инъекции ДГК.

При этом концентрация S-нитрозотиолов (рис. 1В) при ежесуточной инъекции ДГК продолжала повышаться вплоть до окончания эксперимента по сравнению с контрольным опухоленосителем. По-видимому, это связано со снижением окислительного стресса, увеличением немодифицированных SH-групп белков (рис. 1Г), способных к дальнейшему нитрозилированию. Исследовано влияние инъекций флавоноида на динамику численности фагоцитов в плазме крови. Установлено снижение концентрации нейтрофилов по сравнению с контролем.

При инъекциях ДГК наблюдалось принципиально значимое для продолжительности жизни опухоленосителя снижение концентрации опухолевых клеток (рис. 2), что, по-видимому, связано с проявлением цитотоксического действием ДГК по отношению к данному типу клеток и снижением окислительного стресса в плазме крови опухоленосителя.



**Рис. 2.** Изменение концентрации опухолевых клеток в асците при ежесуточном введении ДГК. кривая 1 – контрольный опухоленоситель; кривая 2 – инъекции ДГК.

На основании полученных результатов можно утверждать, что инъекции ДГК вызывают в крови опухоленосителя значительное усиление нитрозилирующего стресса, выраженного в сильной NO-зависимой модификации белков. Данный процесс, по-видимому, связан с увеличением синтеза оксида азота эндотелиальными клетками, т.к. известно, что флавоноиды стимулируют эндотелиальные клетки к выработке NO через увеличение уровня внутриклеточного кальция [9,10]. В то же время в нашей работе обнаружено уменьшение окислительной модификации белков в условиях окислительного и нитрозилирующего стресса в плазме опухоленосителя. Данный факт сопрягается как с антиоксидантными свойствами ДГК, так и со способностью флавоноидов ингибировать активность НАДФН-оксидазы, главного источника эндогенных свободных радикалов. В то же время показано уменьшение синтеза оксида азота в ответ на активацию фагоцитов (LPS) в присутствии флавоноидов [11] через воздействие на транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B. Этот факт согласуется с данными по снижению уровня нитрозилирующего стресса в зоне роста опухоли, где, по-видимому, из-за отсутствия других источников оксида азота, кроме макрофагов и транспорта модифицированных белков из плазмы, флавоноид ДГК снижает продукцию NO. Следуя полученным данным можно говорить об оправданном использовании данного вида флавоноида и рекомендовать рассматривать ДГК как возможный сопутствующий компонент в терапии данного типа опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ackermann R.* // *Nervenarzt.* 1989. 60: 115-9.
2. *van Kessel K.P., Verhoef J.* // *Pathobiology.* 1990. 58: 249-64.
3. *Шаталин Ю.В., Наумов А.А., Поцелуева М.М.* // *Цитология.* 2010. 52(2): 131-5.
4. *Наумов А.А., Поцелуева М.М.* // *Цитология.* 2011. 53(1): 68-74.
5. *Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E. et al.* // *Cancer Res.* 1997. 57: 2916-21.
6. *Caltagirone S., Rossi C., Poggi A. et al.* // *Int. J. Cancer.* 2000. 87: 595-600.
7. *Hornung R.L., Young H.A., Urba W.J., Wiltrout R.H.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1988. 80(15): 1226-31.
8. *Showell H.J., Naccache P.H., Walenga R.W. et al.* // *J. Reticuloendothel. Soc.* 1981. 30: 167-81.
9. *Martin S., Andriambelosen E., Takeda K., Andriantsitohaina R.* // *Br. J. Pharmacol.* 2002. 135: 1579-87.
10. *Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.* // *Pharmacol. Rev.* 2000. 52: 673-51.
11. *Green L.C., Tannenbaum S.R., Fox J.G.* // *N. Engl. J. Med.* 1982. 306: 1367-8.

### ГИПООСМОТИЧЕСКАЯ СТРИКЦИЯ СЕГМЕНТОВ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ ПРИ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ: РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА

*Смаглий Л.В.<sup>1,2</sup>, Гусакова В.С.<sup>1</sup>, Гусакова С.В.<sup>1</sup>, Калинина А.А.<sup>1</sup>,  
Голованов Е.А.<sup>1</sup>, Гуцин Е.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Томский государственный университет, Томск, Россия

**Введение.** Тонус кровеносных сосудов регулируется многими факторами. В частности, к таким факторам относятся внеклеточные нуклеотиды – аденозин-5'-трифосфат (АТФ) и уридин-5'-трифосфат (УТФ). Их основными источниками служат симпатические окончания нервных волокон, эндотелиальные клетки, эритроциты. АТФ неселективно активирует пуринергические рецепторы P2X и P2Y, регулируя сократимость гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, что влияет на показатели артериального давления [1]. УТФ же действует на рецепторы группы P2Y, так же участвуя в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток. Кроме нуклеотидов важными компонентами системы регуляции тонуса кровеносных сосудов являются газотрансмиттеры. Известно, что посредником в передаче сигнала от пуринергических рецепторов является оксид азота [2]. Повышение концентрации внеклеточного АТФ в кровеносном русле сопровождается усилением продукции оксида азота в эндотелиальных клетках, что способствует расслаблению гладкомышечных клеток сосудов. Этот механизм нарушается у пациентов с первичной легочной



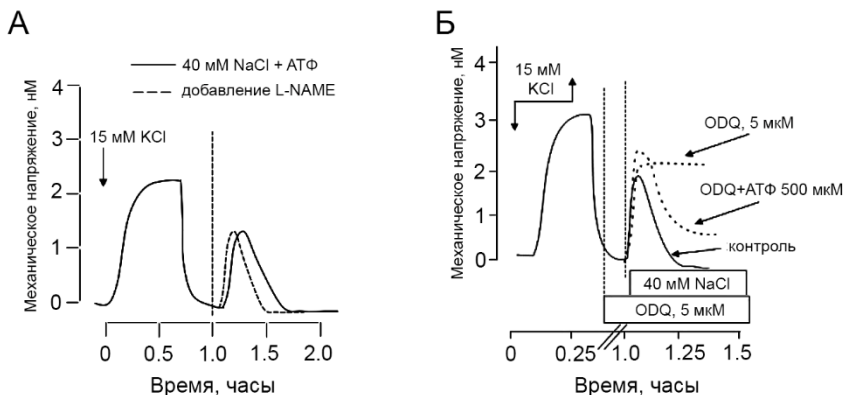
гипертензией [2]. Одновременно с этим стойкое повышение гидростатического давления в малом круге кровообращения сопровождается усилением фильтрации воды в интерстициальное пространство и набуханием ГМК [3], что приводит к активации механизмов регуляторного уменьшения объема и сопутствующей констрикции ГМК вследствие перераспределения ионов  $Cl^-$  и деполаризации клеточной мембраны [4]. Учитывая приведенные выше данные, исследовали роль пуринаргической сигнальной системы в регуляции тонуса сегментов легочной артерии в гипоосмотической среде.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали изолированные кольцевые сегменты ЛА (СЛА) крыс линии Wistar с интактным эндотелием (Э+) и деэндотелизированные (Э-). Исследование сократительной активности гладких мышц проводили методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II (WPI). Гипоосмотическую стрикцию вызывали инкубацией сегментов в гипоосмотическом растворе, содержащем 40 мМ NaCl. Амплитуду ответов рассчитывали в процентах от контрольного сокращения на действие гиперкалиевого раствора Кребса (15 мМ KCl), которые принимали за 100%. Статистическую обработку данных проводили непараметрическим U-критерием Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) с помощью программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «медиана ± Межквартильный размах».

**Результаты.** Добавление 10-100 мкМ АТФ не влияло на базальный тонус СЛА с интактным и удаленным эндотелием. В СЛА (Э-) 500 и 1000 мкМ АТФ вызывали развитие низкоамплитудных транзиторных сократительных ответов амплитудой 3.1 (1.9; 4.0) и 20.2 (16.9; 28.5) % ( $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ) % от контрольного сокращения, которые достоверно не отличались от СЛА (Э+). Помещение СЛА (Э-) в гипоосмотический раствор (40 мМ NaCl) приводило к развитию транзиторного сокращения амплитудой 69.5 (65.3; 85.4) % и длительностью 32.5 (30.0; 39.0) мин ( $n = 11$ ). Амплитуда сокращений СЛА (Э+) в гипоосмотической среде составила 63.9 (60.2; 71.3) %, а длительность – 22.6 (20.3; 31.7) мин ( $n = 3$ ). АТФ (500 мкМ) не оказывал статистически значимого влияния на амплитуду гипоосмотической стрикции (80.5 (74.9; 86.0) % ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ), однако подавлял фазу расслабления в СЛА (Э-), но не СЛА (Э+). Этот эффект устранялся буметанидом и нифлумовой кислотой – ингибиторами НКСС и  $Ca^{2+}$ -активируемых  $Cl^-$ -каналов, соответственно.

Предобработка СЛА (Э+) ингибитором NO-синтазы L-NAME (100 мкМ, предобработка 60 мин) не влияла на амплитуду и форму кривой гипоосмотической стрикции в присутствии АТФ, но уменьшала время её развития до 23.0 (20.2; 26.5) мин (рис. 1А). Ингибитор гуанилатциклазы ODQ (10 мкМ, предобработка 30 мин) увеличивал базальный тонус сосудистых сегментов на 30%, а также увеличивал амплитуду

гипоосмотической стрикции до 89.6 (73.2; 90.8) % ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ), как с АТФ так и без него. При этом на фоне ингибирования гуанилатциклазы сегменты расслаблялись не полностью. Однако в присутствии АТФ величина остаточного механического напряжения была ниже по сравнению с данными в отсутствии АТФ (рис. 1Б). Полученные данные указывают на то, что в сегментах с интактным эндотелием на фоне гипоосмотического набухания гаунилатциклазная система участвует в восстановлении тонуса сегментов, а АТФ действует синергично, вероятно, за счет дополнительной активации NOS и/или гуанилатциклазы.



**Рис. 1.** Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME (50 мкМ) (А) и ингибитора гуанилатциклазы ODQ (5 мкМ) (Б) на гипоосмотическую стрикцию сегментов легочной артерии крысы с эндотелием в присутствии АТФ. По оси ординат – механическое напряжение (нМ), по оси абсцисс – время (часы).

Поскольку АТФ неселективно активирует пуринергические рецепторы как группы P2X, так и группы P2Y, мы дополнительно исследовали действие активатора P2Y-рецепторов УТФ. УТФ, действуя на базальный тонус сегментов, вызывал развитие сократительных ответов большей амплитуды по сравнению с АТФ. В концентрации 500 мкМ УТФ вызывал развитие транзиторного сократительного ответа амплитудой 51.1 (47.9; 54.3) % от контрольного гиперкалиевого сокращения и достоверно увеличивал амплитуду гипоосмотической стрикции деэндотелизированных сегментов до 108.3 (91.3; 124.1) % ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ), не влияя при этом на её длительность. В отличие от действия АТФ, в присутствии УТФ транзиторный характер стрикции частично сохранялся: величина остаточного МН составила 37.1 (33.3; 57.6) % ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ). Буметанид не влиял на амплитуду и длительность гипоосмотической стрикции в присутствии УТФ, тогда как неселективный блокатор Cl-каналов SITS восстанавливал фазу расслабления гипоосмотической стрикции.

**Заключение.** Таким образом, АТФ оказывает констрикторное действие на ГМК в условиях гипоосмотической среды в деэндотелизированных сегментах, но не влияет на тонус сегментов с интактым эндотелием, что связано с активацией гуанилатциклазной системы. Подавление транзиторного характера гипоосмотической стрикции деэндотелизированных сегментов при действии АТФ связано с активацией НКСС и  $Ca^{2+}$ -активируемых Cl-каналов. Эксперименты с УТФ показали, что подавление способности сегментов ЛА восстанавливать исходное механическое напряжение в гипоосмотической среде, вероятно, связано как с P2X, так и с P2Y рецепторами через активацию Cl-каналов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Burnstock G. // Current Topics in Membranes. 2003. 54: 1-27.
2. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. 281(4): 1158-64.
3. Sun X.Z., Tian X.Y., Wang D.W., Li J. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2014. 18(7): 959-64.
4. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V. // Pflugers Archiv. 2004. 449(1): 42-55.

## ФАКТОРЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КЛЕТКАХ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР

*Смекалова А.А., Митяшова О.С., Монтвила Е.К.,  
Алейникова О.В., Лебедева И.Ю.*

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

Гормоны щитовидной железы оказывают плейотропные эффекты у позвоночных, регулируя рост, развитие и функции многих органов, включая гонады [1]. Влияние тиреоидных гормонов на клетки зависит от содержания в последних двух типов ядерных рецепторов,  $\alpha$  и  $\beta$  (THR $\alpha$  и THR $\beta$ ), которые кодируются двумя разными генами, а также мембранных интегриновых рецепторов (IG $\alpha$ V $\beta$ 3) [2]. Через ядерные рецепторы тиреоидные гормоны оказывают геномные эффекты путем рекрутирования коактиваторов для регуляции генной транскрипции [3]. В то же время интегриновый рецептор опосредует гормональное влияние через такие известные сигнальные пути, как митоген-активируемая протеинкиназа, протеинкиназа C и протеинкиназа A [4].

В яичнике птиц, включая кур, обнаружены мРНК ядерных и мембранных рецепторов, необходимых для реализации геномных и негеномных эффектов тиреоидных гормонов [5,6]. Эти данные согласуются с выявленным *in vitro* регуляторным влиянием трийодтиронина на секрецию половых стероидных гормонов фолликулами кур [7], которое указывает на взаимосвязь между репродуктивной и тиреоидной системами. Вместе с тем, нет никакой информации об экспрессии в фолликулярных клетках птиц самих тиреоидных рецепторов, а также о физиологических факторах, регулирующих такую экспрессию.

Как известно, овуляторный цикл птиц зависит от преовуляторной волны лютеинизирующего гормона и половых стероидных гормонов [8], тогда как роль тиреоидной системы в его регуляции не ясна. Кроме того, преовуляторное повышение репродуктивных гормонов может влиять на экспрессию фолликулярных рецепторов, изменяя чувствительность клеток к соответствующим гормонам [9]. В этой связи нами проведено сравнительное исследование экспрессии тиреоидных рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов с разной степенью зрелости в различные стадии овуляторного цикла у кур: до преовуляторной волны гормонов и во время этой волны.

**Методы исследования.** Яичники получали у молодых кур-несушек (в возрасте 30-33 недели) через 7.5 ч (середина овуляторного цикла) и 21 ч (время преовуляторной волны) после предшествующей овуляции. Предварительные исследования подтвердили наличие преовуляторного повышения концентрации половых стероидных гормонов в крови исследуемых кур через 21 ч после овуляции. В эксперименте использовали два самых больших желтых фолликула F1 и F2, где F1 – фолликул, предназначенный для овуляции в следующем цикле. Слой клеток гранулезы выделяли согласно методу А.В. Gilbert и соавт. [10] и отмывали от желтка фосфатным буферным раствором Дюльбекко, Клетки гранулезы выделяли из соответствующего слоя согласно методике, описанной ранее [11].

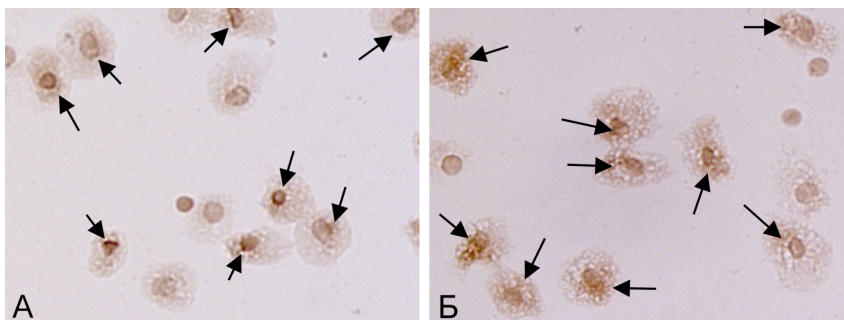
После выделения клетки фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида и пермеабилizировали 0.2%-ным раствором Тритона X-100. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов блокировали путем обработки клеток 10%-ным раствором нормальной лошадиной сыворотки (Abscam, Великобритания). Образцы инкубировали с первичными кроличьими антителами к THR $\alpha$  или THR $\beta$  (Affinity, КНР) при 4 С в течение 18 ч и затем – со вторыми биотинилированными антителами (Vector Laboratories, Inc., США) при комнатной температуре в течение 30 мин. Для визуализации специфического связывания применяли

Vectastain ABC reagent и коричневый хромофор DAB (Vector Laboratories, Inc., США). Микрофотографирование проводили под микроскопом Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 400×. Долю клеток с позитивной реакцией на антитела к рецепторам оценивали по числу клеток, окрашенных в коричневый цвет (рис. 1).

Для каждой временной точки было использовано 4 птицы. Полученные результаты обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.) и выражали как средние значения ± стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

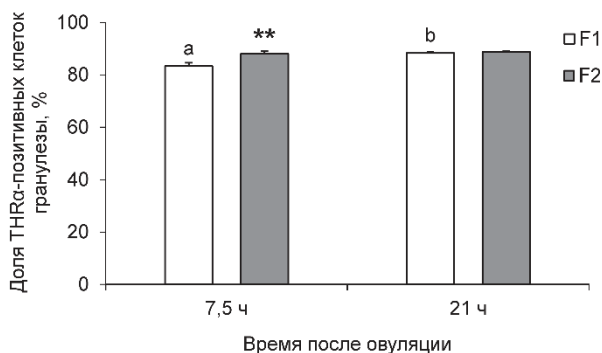
### Результаты исследования и их обсуждение.

Иммуноцитохимический анализ выявил присутствие тиреоидных ядерных рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов молодых кур. При этом более 80% клеток показывали позитивную реакцию на антитела к рецепторам обоого типа (рис. 1).



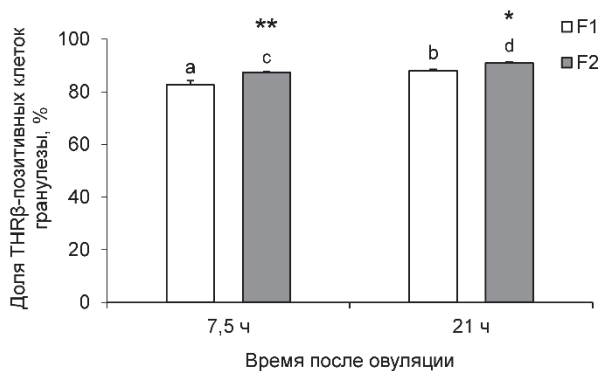
**Рис. 1.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии тиреоидных рецепторов  $THR\alpha$  (А) и  $THR\beta$  (Б) в клетках гранулезы кур. Стрелками показано позитивное окрашивание (DAB) на антитела к  $THR\alpha$  или  $THR\beta$ .

В середине овуляторного цикла доля  $THR\alpha$ -позитивных гранулезных клеток в фолликулах F1 была в 1.1 раза ниже ( $P < 0.01$ ), чем доля таких клеток в фолликулах F2 (рис. 2). В то же время через 21 ч после овуляции экспрессия рецепторов  $THR\alpha$  в клетках из фолликулов F1 повышалась в 1.1 раза ( $P < 0.01$ ) и не отличалось от таковой в фолликулах F2.



**Рис. 2.** Экспрессия тиреоидных ядерных рецепторов  $\alpha$  (THR $\alpha$ ) в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов кур в разные периоды овуляторного цикла. Достоверные различия: <sup>a,b</sup>P < 0.01. <sup>\*\*</sup>P < 0.01 (между F1 и F2).

Доля клеток гранулезы с положительной реакцией на антитела к рецепторам THR $\beta$  достоверно возрастала между серединой овуляторного цикла и временем преовуляторной волны, как в фолликулах F1 (P < 0.01), так и, в меньшей степени, в фолликулах F2 (P < 0.05) (рис. 3). Кроме того, экспрессия рецепторов THR $\beta$  в клетках была ниже в фолликулах F1, чем фолликулах F2 в случае обеих стадий овуляторного цикла (P < 0.01-0.05).



**Рис. 3.** Экспрессия тиреоидных ядерных рецепторов  $\beta$  (THR $\beta$ ) в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов кур в разные периоды овуляторного цикла. Достоверные различия: <sup>a,b</sup>P < 0.01; <sup>c,d</sup>P < 0.05. <sup>\*</sup>P < 0.05; <sup>\*\*</sup>P < 0.01 (между F1 и F2).

Согласно имеющимся данным, в период яйцекладки преовуляторное повышение репродуктивных гормонов у кур происходит за 4-6 ч до овуляции в каждый овуляторный цикл [8]. Строгая цикличность изменения гормональных уровней позволяет проводить неинвазивное исследование влияния преовуляторной волны на различные процессы, сопряженные с овуляторным циклом. Кроме того, представляется возможным охарактеризовать роль различных факторов в созревании фолликулов и индукции овуляции.

Ранее в работе К. Brady и соавт. [6] была исследована экспрессия генов, кодирующих тиреоидные ядерные рецепторы  $\alpha$  и  $\beta$ , в клетках гранулезы из фолликулов F1 на разных стадиях овуляторного цикла у молодых индеек. Авторы не обнаружили существенных различий в клеточном содержании мРНК тиреоидных рецепторов во время преовуляторной волны по сравнению с базальным периодом, вероятно, вследствие достаточно высокой вариабельности данных. В то же время в нашем исследовании наблюдалось повышение экспрессии рецепторов обоого типа и, следовательно, чувствительности клеток гранулезы к тиреоидным гормонам, главным образом, в случае фолликулов F1, предназначенных для овуляции в следующем цикле.

Таким образом, полученные данные указывают на возможное участие тиреоидных гормонов через свои ядерные рецепторы, присутствующие в клетках гранулезы, в овуляторном процессе у кур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-16-00149).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A. // *Physiol. Rev.* 2014. 94: 355-82.
2. Hammes S.R., Davis P.J. // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. 29: 581-93.
3. Cheng S.Y., Leonard J.L., Davis P.J. // *Endocr. Rev.* 2010. 31: 139-70.
4. Davis P.J., Leonard J.L., Davis F.B. // *Front. Neuroendocrinol.* 2008. 29: 211-8.
5. Sechman A. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013. 190: 68-75.
6. Brady K., Long J.A., Liu H.C., Porter T.E. // *Poult. Sci.* 2021. 100: 100928.
7. Sechman A., Pawlowska K., Rzasca J. // *Domest. Anim. Endocrinol.* 2009. 37: 61-73.
8. Etches R.J. // *Crit. Rev. Poult. Biol.* 1990. 2: 293-318.
9. Lebedeva I.Y., Lebedev V.A., Grossmann R. et al. // *Biol. Reprod.* 2004. 71: 1174-81.
10. Gilbert A.B., Evans A.J., Perry M.M., Davidson M.H. // *J. Reprod. Fertil.* 1977. 50: 179-81.
11. Lebedeva I.Y., Lebedev V.A., Grossmann R., Parvizi N. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010. 8: 15.

## ЭНДОКРИННОЕ И ПАРАКРИННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ ИЗ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ

*Смекалова А.А., Митяшова О.С., Алейникова О.В.,  
Монтилла Е.К., Лебедева И.Ю.*

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

Соматотропный гормон (СТГ) служит важным позитивным модулятором репродуктивной функции самок. Соматотропные рецепторы и их мРНК обнаружены в яичнике птиц [1-3], что свидетельствует о влиянии данного гормона на овариальную функцию у этого класса позвоночных. В литературе имеется ряд данных, указывающих на участие СТГ в контроле роста и развития фолликулов у птиц, в том числе путем модуляции пролиферативной и стероидогенной активности, а также апоптоза фолликулярных клеток [4-6]. Однако характер его влияния, очевидно, зависит от стадии созревания фолликулов, типа фолликулярных клеток и ряда других факторов.

Паракринное взаимодействие клеток теки и гранулезы является важным компонентом системы локального контроля процессов роста и развития фолликулов в яичниках млекопитающих [7]. Локальный контроль фолликулогенеза также функционирует у птиц [8,9], однако характер и физиологические регуляторы дистантного взаимодействия клеток теки и гранулезы исследованы у них лишь в незначительной степени [10]. Как известно, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) синтезируется локально в яичнике кур и служит посредником некоторых эффектов СТГ [6,8]. Вероятно, что и другие паракринные факторы также могут модулировать влияние СТГ на яичник у домашних кур.

В связи с вышеизложенным, целью представленного исследования было изучение характера и путей влияния гормона роста на функциональное состояние клеток гранулезы из преовуляторных фолликулов кур, а также участие паракринного взаимодействия в регуляции этого влияния.

**Методы исследования.** В эксперименте были использованы молодые куры-несушки в возрасте 27-34 недели с длинными циклами яйцекладки (не менее 10 яиц в каждом цикле). Овариэктомию птиц проводили через 7 ч после снесения яйца для синхронизации функциональной активности фолликулярных клеток. Слои теки и гранулезы выделяли из двух самых больших желтых фолликулов F1 и F2 согласно методике, описанной ранее [11]. Предварительно, из гранулезного слоя удаляли часть, прилегающую к зародышевому диску.

Для получения кондиционированных сред слои теки и гранулезы разрезали на 2 части и культивировали в течение 18 ч в 3 мл среды DMEM,



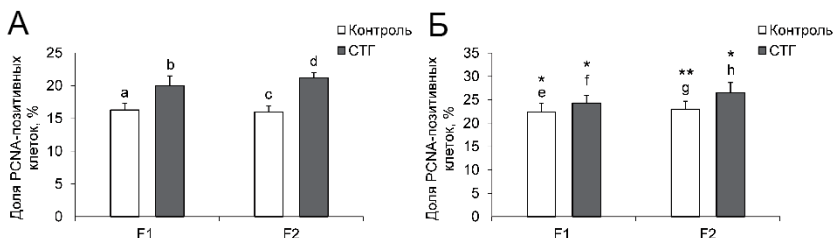
содержащей 25 мМ НЕРЕS, 1 г/л глюкозы, 1 мМ глутамина и 10 мл/л раствора антибиотика-антимикотика (все – Sigma-Aldrich, США), в отсутствие или в присутствии 25 нг/мл рекомбинантного СТГ кур (ProSpec, Израиль). Концентрация 25 нг/мл СТГ была выбрана на основании наших предыдущих исследований [12]. После культивирования среды замораживали и хранили при –30°C. В аликвотах кондиционированных сред (n = 6) определяли содержание ИФР1 методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов (Cloud-Clone, КНР).

Клетки гранулезы выделяли из соответствующего слоя согласно методике, описанной ранее [13], и культивировали в чашках Петри на покровных стеклах в вышеописанной среде с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США). После образования монослоя среду заменяли на свежую среду без сыворотки и культивировали клетки в течение 24 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии рекомбинантного СТГ кур в концентрации 25 нг/мл, а также в средах, кондиционированных текой с и без СТГ.

После культивирования клетки фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида, пермеабелизовали Тритоном X-100 и обрабатывали блокирующей сывороткой, как описано ранее [12]. Образцы инкубировали с первичными мышиными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (*PCNA*, *Clone PC10*, *Dako*, USA) или к проапоптотическому белку *Bax* (*Clone 2D2*, *Bio-Rad*, USA) и затем – со вторыми биотинилированными антителами. Для визуализации специфического связывания применяли Vectastain ABC reagent и коричневый хромофор DAB. Долю PCNA- и *Bax*-позитивных клеток оценивали на основании отношения числа клеток, окрашенных в коричневый цвет, к общему числу клеток.

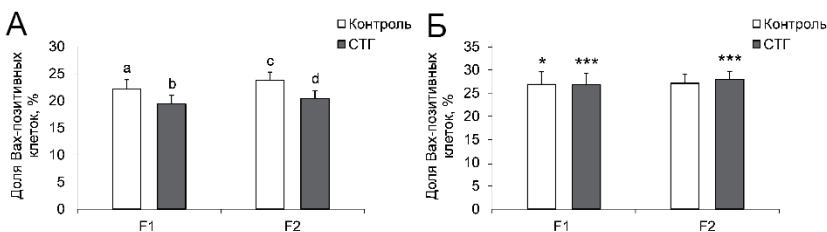
Эксперименты по культивированию клеток проводили в 9 независимых повторностях. В каждом независимом эксперименте были использованы фолликулярные слои или клетки, полученные от одной курицы. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с повторными измерениями по программе SigmaStat (Systat Software, Inc.), для вычисления достоверности различий использовали критерий Тьюки.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В стандартной среде было обнаружено стимулирующее действие СТГ на пролиферативную активность клеток гранулезы из фолликулов F1 и F2 (рис. 1А). При этом СТГ повышал в 1.2-1.3 раза ( $p < 0.01-0.05$ ) долю PCNA-позитивных клеток. Культивирование гранулезных клеток из фолликулов F1 и F2 в среде, кондиционированной соответствующим слоем теки, приводило к повышению в 1.4 раза ( $p < 0.01-0.05$ ) доли клеток с позитивной реакцией на PCNA, по сравнению с таковой в контрольной стандартной среде (рис. 1Б). В то же время среда, кондиционированная текой при воздействии СТГ, обуславливала дополнительное повышение пролиферативной активности клеток гранулезы в 1.1-1.2 раза ( $p < 0.05$ ).



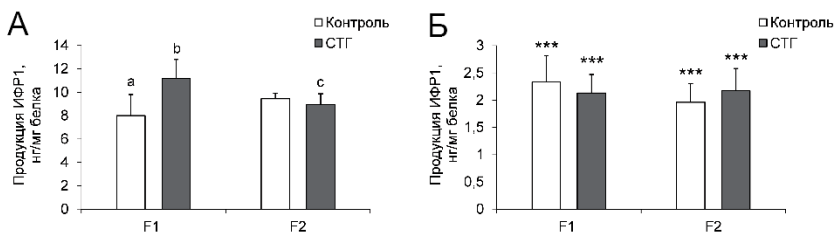
**Рис. 1.** Экспрессия маркера пролиферации PCNA в культивируемых клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов кур при прямом воздействии СТГ (А) и гормональном воздействии, опосредованном клетками теки (Б). Различия между средними значениями внутри культуральной системы: <sup>a,b</sup> $p < 0.05$ ; <sup>c,d</sup> $p < 0.01$ ; <sup>e,f</sup> $p < 0.05$ ; <sup>g,h</sup> $p < 0.05$ . Различия между стандартной средой и средой, кондиционированной текой: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Кроме того, СТГ снижал в 1.1-1.2 раза ( $p < 0.01-0.05$ ) экспрессию проапоптотического белка Вах в клетках гранулезы, инкубируемых в стандартной среде (рис. 2А). Вместе с тем культивирование гранулезных клеток в средах, кондиционированных текальным слоем в присутствии и в отсутствие СТГ, приводило к одинаковому уровню экспрессии Вах. При этом доля Вах-позитивных клеток была в 1.2-1.4 раза выше, чем в стандартной среде ( $p < 0.001-0.05$ ), за исключением контрольной группы клеток из фолликулов F2 (рис. 2Б).



**Рис. 2.** Экспрессия проапоптотического белка Вах в культивируемых клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов кур при прямом воздействии СТГ (А) и гормональном воздействии, опосредованном клетками теки (Б). Различия между средними значениями внутри культуральной системы: <sup>a,b</sup> $p < 0.05$ ; <sup>c,d</sup> $p < 0.01$ . Различия между стандартной средой и средой, кондиционированной текой: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Показано, что СТГ повышал в 1.4 раза ( $p < 0.01$ ) продукцию ИФР1 клетками гранулезы из фолликулов F1, но не влиял на нее при использовании клеток из фолликулов F2 (рис. 3А). Способность текального слоя секретировать ИФР1 не зависела от СТГ и была в 3-5 раз ниже, чем таковая гранулезного слоя (рис. 3Б).



**Рис. 3.** Продукция ИФР-1 при культивировании эксплантатов слоя гранулезы (А) и теки (Б) из преовуляторных фолликулов F1 и F2 в отсутствие и в присутствии СТГ. Различия между средними значениями внутри культуральной системы:  $a,b,p < 0.01$ ;  $b,c,p < 0.05$ . Различия между гранулезой и текой:  $***p < 0.001$ .

Таким образом, СТГ оказывал умеренное ростостимулирующее влияние на клетки гранулезы из двух самых зрелых преовуляторных фолликулов у кур-несушек. Ранее была показана более выраженная способность этого гормона в сходной концентрации стимулировать пролиферацию гранулезных клеток из преиерархических фолликулов (быстрее растущих и подверженных атрезии/апоптозу), причем этот гормональный эффект был, очевидно, связан с усилением локальной продукции ИФР1 [6]. Тем не менее в нашем исследовании ИФР1 не мог выступать в качестве паракринного посредника, поскольку СТГ усиливал его секрецию только клетками из фолликулов F1, тогда как ростостимулирующее влияние гормона наблюдалось в случае обоих фолликулов. Кроме того, СТГ слегка снижал экспрессию *проапоптотического* белка Вах в гранулезных клетках, изменяя тем самым баланс проапоптотических и антиапоптотических факторов.

Полученные нами результаты также указывают на способность клеток теки усиливать ростостимулирующее влияние СТГ на клетки гранулезы, которая реализуется посредством паракринного механизма, не связанного с усилением продукции ИФР1 текой. В то же время воздействие СТГ на теку не приводило к изменению экспрессии Вах в клетках гранулезы. При этом в отсутствие СТГ клетки теки, очевидно, сами способны оказывать ростостимулирующее и проапоптотическое действие на клетки гранулезы, опосредованное паракринным механизмом.

В целом, представленные данные свидетельствуют об участии СТГ у молодых кур в регуляции роста и развития фолликулов на завершающей стадии созревания путем стимуляции пролиферации и торможения апоптоза клеток гранулезы. Кроме того, они предполагают возможность модуляции текой ростостимулирующего влияния СТГ на гранулезные клетки.

Работа выполнена по государственному заданию (тема 0445-2021-0004).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou Y.C., Fu Q.G., Zhao R.Q. et al. // Yi Chuan Xue Bao. 2003. 30: 840-6.
2. Lebedeva I.Y., Lebedev A., Grossmann R. et al. // Biol. Reprod. 2004. 71: 1174-81.
3. Ahumada-Solórzano S.M., Carranza M.E., Pedernera E. et al. // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. 175: 297-310.
4. Mohammadi H., Ansari-Pirsaraei Z. // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.). 201498: 483-90.
5. Hrabia A. // Gen. Comp. Endocrinol. 2015. 220: 112-8.
6. Ahumada-Solórzano S.M., Martínez-Moreno C.G., Carranza M. et al. // Gen. Comp. Endocrinol. 2016. 234: 47-56.
7. Orisaka M., Tajima K., Tsang B.K., Kotsuji F. // J. Ovarian Res. 2009. 2: 9.
8. Roberts R.D., Sharp P.J., Burt D.W., Goddard C. // Gen. Comp. Endocrinol. 1994. 93: 327-36.
9. Yao H.H., Bahr J.M. // Biol. Reprod. 2001. 64: 1790-6.
10. Wang L., Croze F., Morley P., Tsang B.K. // Biol. Reprod. 1993. 49: 924-32.
11. Gilbert A.B., Evans A.J., Perry M.M., Davidson M.H. // J. Reprod. Fertil. 1977. 50: 179-81.
12. Смекалова А.А., Митяшова О.С., Алейникова О.В. и др. // Генетика и разведение животных. 2021. 4: 108-13.
13. Lebedeva I.Y., Lebedev V.A., Grossmann R., Parvizi N. // Reprod. Biol. Endocrinol. 2010. 8: 15.

### ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ ИММУНОЦИТАМИ КРОВИ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* (НА ПРИМЕРЕ ВАКЦИННОГО АНТИГЕНА SARS-CoV-2)

Старкова К.Г.<sup>1</sup>, Долгих О.В.<sup>1,2</sup>, Аликина И.Н.<sup>1</sup>, Казакова О.А.<sup>1</sup>,  
Алексеев В.Б.<sup>1</sup>, Никоношина Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Пермь, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

**Введение.** В условиях глобальной пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, проводятся многочисленные исследования, направленные на выяснение особенностей иммунопатогенеза COVID-19 [1,2]. Противовирусный иммунный ответ включает выработку ключевых цитокинов, участвующих в инициации иммунных реакций (интерлейкин (IL)-2), провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, интерферон (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), противовоспалительных факторов (IL-10, IL-4),

однако, индивидуальные профили секреции цитокинов у пациентов могут существенно отличаться, предотвращая развитие инфекции или способствуя формированию тяжелых осложнений при чрезмерной активации, как происходит в случае феномена «цитокинового шторма» [3,4].

**Цель работы** – выполнить экспериментальное исследование экспрессии маркеров цитокиновой иммунной регуляции в условиях симуляции *in vitro* экзогенной SARS-CoV-2-вирусной нагрузки.

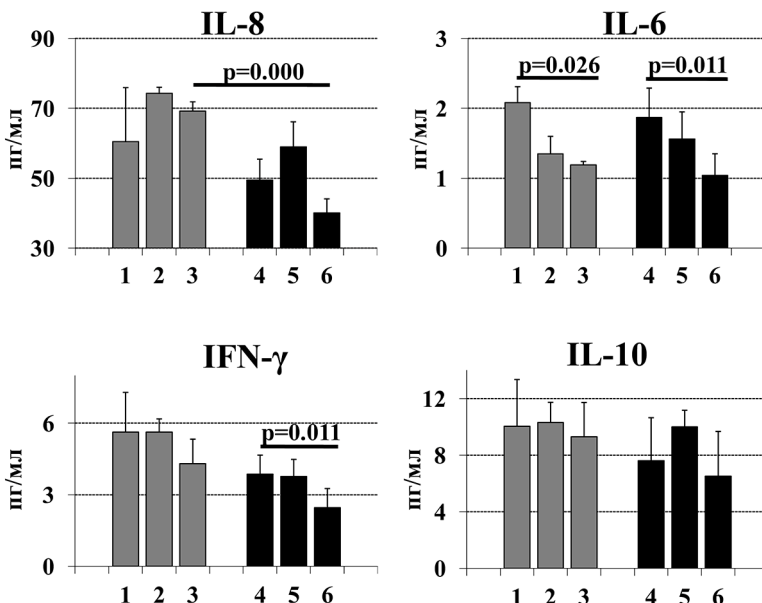
**Материалы и методы.** В исследовании использовали образцы периферической венозной крови условно здоровых доноров в возрасте 7-13 лет. Культивировали смешанную популяцию иммунокомпетентных клеток (Т-хелперы, В-клетки, NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты), выделенную на градиенте плотности фиколл-верографин. Клетки инкубировали в количестве 68 проб 72 часа, используя персональный специализированный CO<sub>2</sub>-инкубатор Sanyo MCO-5AC (Япония) при температуре 37°C. В качестве маркеров эффекта изучали цитокины: IL-8, IL-6, IL-10, IFN-γ. Моделирование эксперимента осуществляли рекомбинантными аденовирусными частицами 26 серотипа ((1.0 ± 0.5) × 10<sup>11</sup> частиц/доза (0.5 мл)), содержащими ген белка S вируса SARS-CoV-2 в концентрации 0.007 мг/мл. В качестве эндогенных модификаторов продукции цитокинов использовали макрофагальный медиатор IL-1β в концентрации 100 пг/мл и глюкокортикоидный гормон кортизол в концентрации 600 нмоль/л. Количественное определение содержания цитокинов в полученных супернатантах клеточных культур проводили при помощи диагностических тест-систем методом твердофазного иммуоферментного анализа на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan Austria GmbH, Австрия).

Статистическую обработку материала выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistical10.0 (StatSoft, США). Статистическая достоверность различий оценивалась по парному t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0.05$ .

**Результаты.** В условиях проведенного эксперимента *in vitro* модифицирующее воздействие SARS-CoV-2-вирусной нагрузки показало супрессию продукции компонентов цитокинового профиля (рис. 1), в среднем на 11-46% относительно спонтанной продукции.

Аналогичные тенденции наблюдались при внесении в культуры клеток вакцинного антигена SARS-CoV-2 и эндогенного модулятора кортизола с достоверным эффектом в отношении экспрессии IL-6 в 1.8 раза и IFN-γ в 1.57 раза при сравнении с SARS-CoV-2-контрольными пробами ( $p = 0.011$ ). Аналогично кортизол в условиях изолированной экспозиции формировал угнетение экспрессии цитокинов, с достижением достоверной разницей в отношении IL-6 в 1.75 раза ( $p = 0.026$ ). Снижение продукции IL-8 в среднем в 1.72 раза отмечено по отношению к

спонтанной его экспрессии ( $p = 0.000$ ), в то время как аналогичное падение экспрессии IFN- $\gamma$  (снижение в 1.75 раза) носило характер тенденции. Следует также отметить, что внесение эндогенного симулятора IL-1 $\beta$  приводило к активации экспрессии IL-8, которая снималась присутствием вакцинного антигена SARS-CoV-2.



**Рис. 1.** Особенности изменения цитокинового профиля в эксперименте *in vitro*: 1 – спонтанная продукция; 2 – IL-1 $\beta$ ; 3 – кортизол; 4 – SARS-CoV-2; 5 – SARS-CoV-2+IL-1 $\beta$ ; 6 – SARS-CoV-2 + кортизол. p – уровень статистической значимости различий.

Результаты проведенного экспериментального моделирования SARS-CoV-2-нагрузки продемонстрировали снижение продукции провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  в присутствии эндогенного модулятора кортизола ( $p < 0.05$ ). Известно, что новая коронавирусная инфекция (SARS-CoV-2) модифицирует ответ иммунокомпетентных клеток, видоизменяя продукцию иммуномедиаторов, что отражается гиперэкспрессией лигандных форм цитокинов и усилении воспалительных процессов у пациентов с COVID-19 [5,6]. Однако многие исследования показывают способность вирусов угнетать реализацию иммунного ответа через down-регуляцию и истощение функций Т-клеточного звена, при этом особенности иммуномодулирующих эффектов часто зависят от тяжести течения заболевания [7]. В исследованиях *in vitro* с использованием культур клеток

от пациентов с тяжелыми формами COVID-19 отмечено снижение синтеза IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17A и фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  по сравнению с пациентами с умеренным клиническим течением заболевания и здоровыми донорами, а также значительное снижение способности продуцировать Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 цитокины в ответ на неспецифическую антигенную стимуляцию [8-10]. Кроме того, «иммунологический коллапс», связанный с выраженной иммуносупрессией и недостаточностью протективного иммунитета контролировать распространение вируса, наряду с «цитокиновым штормом» рассматривается как важнейший механизм заболеваемости и смертности, вызываемых COVID-19 [11].

**Заключение.** Таким образом, проведенное экспериментальное моделирование эффектов SARS-CoV-2-вирусной нагрузки на цитокин-продуцирующую функцию иммунокомпетентных клеток позволило выявить преимущественное угнетение экспрессии цитокиновых медиаторов провоспалительного профиля в условиях изолированной SARS-CoV-2-стимуляции *in vitro*, при этом глюкокортикоидная модуляция усугубляла эффект иммуносупрессии. Полученные результаты дополняют и объясняют известные особенности новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (формирование постковидных осложнений, астении и рецидивирующих ДНК-вирусных инфекций) и указывают на необходимость дальнейших исследований межклеточных и межсистемных эффектов, ассоциированных с персистенцией SARS-CoV-2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зольникова О.Ю., Свистунов А.А., Ивашкин В.Т. // Экология человека. 2021. 1: 4-10.
2. Йокота Ш., Куройва Е., Нишиока К. // Инфекционные болезни. 2020. 9(4(35)): 13-25.
3. Костюк С.А., Смирский В.В., Горбич Ю.Л. и др. // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2021. 1: 41-52.
4. Ghazavi A., Ganji A., Keshavarzian N. et al. // Cytokine. 2021. 137: 155323.
5. Абакушина Е.В. // Гены и клетки. 2020. 15(3): 14-21.
6. Costela-Ruiz V.J., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J.M. et al. // Cytokine & growth factor reviews. 2020. 54: 62-75.
7. Chen G., Wu D., Guo W. et al. // The Journal of clinical investigation. 2020. 130(5): 2620-9.
8. Essa S., Shamsah M., Alsarraf A.H. et al. // Microorganisms. 2022. 10(11): 2194.
9. Zivancevic-Simonovic S., Jovanovic D., Cupurdija V. et al. // Inflammation research. 2022. 71(3): 331-41.
10. Chelakova Yu., Dolgikh O. // 20th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2020. Sofia. 2020. С. 591-8.
11. Remy K.E., Mazer M., Striker D.A. // JCI insight. 2020. 5(17): e140329.

# СУКЦИНАТ/SUCNR1 СИГНАЛИЗАЦИЯ ОГРАНИЧИВАЕТ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА СТАРЫХ КРЫС

*Терехина О.Л., Кирова Ю.И.*

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

**Введение.** Старение организма сопровождается прогрессией системного вялотекущего асептического воспаления, провоцирующего и потенцирующего развитие возраст-ассоциированных патологий. Несмотря на высокую медико-социальную значимость проблемы старческого персистирующего воспаления, причины и механизмы этого явления остаются не вполне понимаемыми, так же как подходы к его коррекции [1].

Специфической характеристикой старения является гиперактивация нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси и гиперпродукция глюкокортикоидов (ГК), которая признается триггерным и центральным механизмом в биологии старения человека [2]. Наиболее пагубно гиперкортизолемиа влияет на нервную ткань, поскольку вызывает дистрофические изменения нейронов и глии, амилоидогенез, нейровоспаление [3]. ГК, через активацию глюкокортикоидных рецепторов (ГР) индуцируют экспрессию субъединиц ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов (N-methyl-D-aspartate ресептор, NMDAR), являются аллостерическими активаторами NMDAR, потенцируют эксайтотоксическую гибель нейронов и NMDAR-зависимую провоспалительную поляризацию микроглии [4,5].

Хронический стресс в старческом возрасте усугубляет ГК-зависимые воспалительно-дегенеративные изменения в гиппокампе и префронтальной коре, способствует снижению когнитивных функций и рассматривается как ведущий фактор в развитии болезни Альцгеймера [3,4]. Таким образом, в коррекции старческого нейровоспаления патогенетически обоснованно применение противовоспалительных агентов, проявляющих антиглюкокортикоидные (проанаболические) и антиглутаматные (антиэксайтотоксические) эффекты [3].

В исследованиях 2016-2022 гг показана иммуномодулирующая активность эндогенного метаболита, интермедиата цикла трикарбоновых кислот янтарной кислоты (сукцинат), реализуемая через активацию специфического G-белок-сопряженного рецептора SUCNR1, экспрессируемого всеми типами иммунцитов [6]. SUCNR1 является сенсором экстраклеточного сукцината, продукция которого увеличивается при гипоксии/ишемии и воспалении в восстановительном (обращенном) цикле Кребса [6]. В 2021 г было показано, что сукцинат SUCNR1-опосредованно вызывает противовоспалительную гиперполяризацию



макрофагов [7]. SUCNR1 отрицательно регулирует воспалительную активацию макрофагов, снижая экспрессию IL-1 $\beta$  на уровне мРНК и секрецию IL-6 и TNF- $\alpha$  на уровне белка [8]. Сукцинат/SUCNR1-сигнализация в ЦНС оказывает антигипоксические и трофические эффекты, такие как активация ангиогенеза, митохондриогенеза, аксонального роста [9-11], ограничивая атрофогенное влияние продолжительной ГК/ГР-сигнализации. Более того, сукцинат проявляет противосудорожное, анксиолитическое, седативное действие и потенциально антиглутаматергическую активность [12-14]. В 2021-2022 гг нами было показано, что курсовое применение сукцинатсодержащего препарата мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат) оказывает противовоспалительное действие при хроническом старческом нейровоспалении, увеличивает экспрессию маркеров и формирование морфологических черт гомеостатического (разветвленного) фенотипа микроглии в коре головного мозга и CA1 поле гиппокампа стареющих крыс [15,16].

Стресс сопряжен как с нейровоспалением, так и с гипоксией [3], однако роль сукцината как ключевого антигипоксического и противовоспалительного (иммунометаболит) сигнала в развитии стресс-реакции остается неисследованной.

**Цель работы** заключалась в оценке влияния сукцинат/SUCNR1-сигнализации на развитие стресс-индуцированного нейровоспаления в коре головного мозга стареющих крыс.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 3 (молодые), 6 (средневозрастные), 18 (старые) месяцев. Животные были выращены в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИОПП». Протоколы экспериментов были утверждены этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП».

**Хронический иммобилизационный стресс** моделировали путем ограничения подвижности животных в индивидуальных пластиковых пеналах (15 см  $\times$  9 см  $\times$  9 см) с вентиляционными отверстиями. На протяжении стрессирующего воздействия животные не имели доступа к пище и воде, находились под ярким направленным освещением. Продолжительность иммобилизации составляла 6 ч в день (12:00-18:00). Стрессирование проводили ежедневно в течение 5 дней [17].

**Фармакологические препараты.** В работе был использован сукцинатсодержащий препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат; ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», 50 мг/мл) для внутрибрюшинного (в/б) введения в дозе 100 мг/кг, ежедневно, в течение 5 дней, за 15 минут до начала стрессирования. С целью оценить влияние ЭМГП на анализируемые показатели был использован препарат эмоксипин (ЭМГП гидрохлорид; Московский Эндокринный Завод; 10 мг/мл) для в/б введения в дозе 54 мг/кг,

эквивалентной содержанию ЭМГП в составе примененной дозы мексидола. Эмоксипин вводили ежедневно, в течение 5 дней, за 15 минут до начала стресс-сеанса.

**Схема экспериментов.** Было выполнено пять экспериментальных серий: (1) 5-дневное стрессирование крыс в возрасте 3 месяцев; (2) 5-дневное стрессирование 6-месячных крыс; (3) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс; (4) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс с предварительным введением ЭМГП сукцината; (6) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс с предварительным введением ЭМГП гидрохлорида. Животных декапитировали под эфирным наркозом после очередного стрессирования. Мозг извлекали, отделяли на льду кору головного мозга (КГМ). Образцы КГМ хранили в жидком азоте.

**Вестерн-блот анализ.** Белки лизата КГМ [18] разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроолюцией. Мембрану инкубировали с первичными антителами (разведение 1:500; 14 ч; 4°C; Santa Cruz Biotechnology, США) против IL-1 $\beta$  (sc-515598), TNF- $\alpha$  (sc-52746), IL-10 (sc-57245), TGF- $\beta$ 1 (sc-130348), PGC-1 $\alpha$  (sc-518025), GR $\alpha$ / $\beta$  (sc-393232), SUCNR1 (sc-50466), VEGF (sc-365578); вторичными антителами (разведение 1:5000; 1 ч; 4°C), конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-mouse sc-516102; anti-rabbit sc-2030). В качестве контроля использовали антитела к актину (sc-376421). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

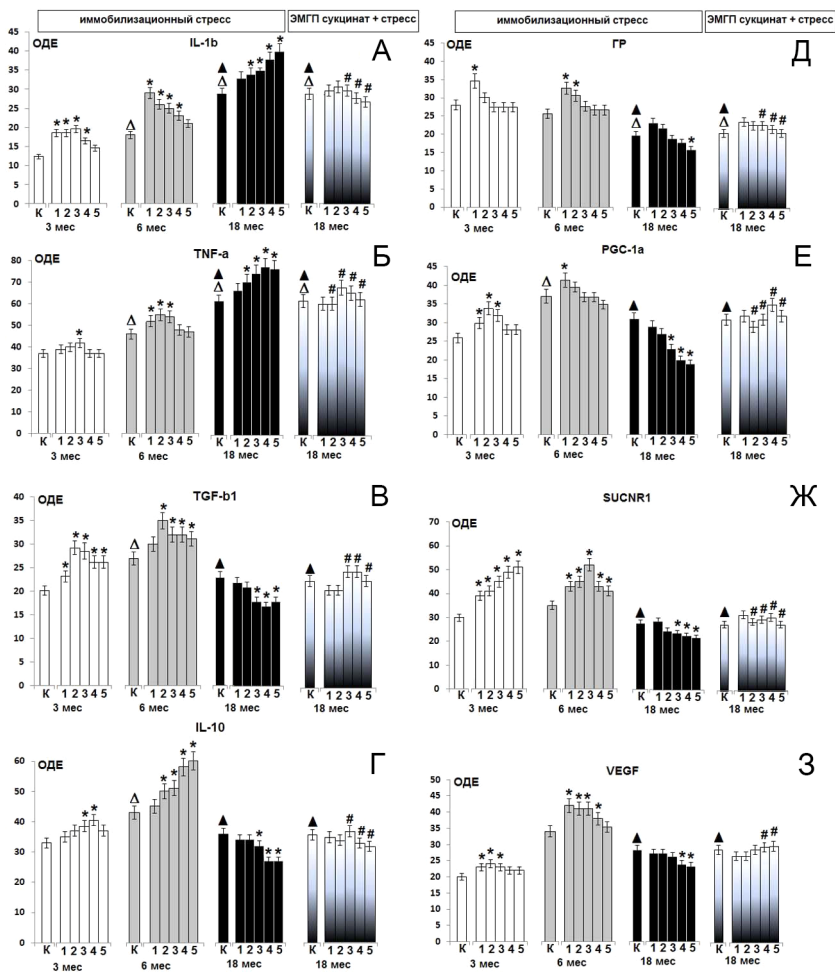
**Статистический анализ** данных выполняли с помощью программных пакетов Statistica 10,0 (Stat soft Inc., США). Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты и обсуждение.** Базовый уровень экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) увеличивался возрастзависимо: IL-1 $\beta$  – на 50% у средневозрастных и на 140% у старых крыс, а TNF- $\alpha$  – на 25% у средневозрастных и на 70% у старых особей в сравнении с молодыми (рис. 1А, Б). Эта зависимость была ранее продемонстрирована, отражает возрастзависимую прогрессирующую провоспалительную трансформацию микроглии – основного источника воспалительных цитокинов в ЦНС [19]. Уровень противовоспалительных цитокинов (TGF- $\beta$ 1, IL-10) достигал пиковых значений в группе средневозрастных крыс (рис. 1В,Г). В индукции IL-10 и TGF- $\beta$ 1 задействованы ГК, половые, тиреоидные гормоны, инсулин, регуляторный потенциал которых наиболее высок в средневозрастном периоде [20]. Уровень TGF- $\beta$ 1 и IL-10 был снижен у старых крыс на 20% в сравнении с

6-месячными средневозрастными особями. Полученные данные согласуются с возрастзависимым снижением в КГМ уровня экспрессии ГР: на 20% у старых крыс в сравнении с молодыми и средневозрастными (рис. 1Д), что связано с возрастной гиперсекрецией ГК, развитием гомологичного подавления ГР собственного гена (отрицательная ауторегуляция) и снижения чувствительности микроглии к противовоспалительным влияниям ГК [21]. Ослабление противовоспалительных механизмов связано с возрастзависимой супрессией транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) (на 20% в сравнении с 6-месячными крысами; рис. 1Е), координирующего активность широкого спектра ядерных рецепторов/лигандзависимых факторов транскрипции с противовоспалительной активностью (ГР, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , ERR $\alpha$ , андрогеновый, эстрогеновый, прогестероновый, тиреоидные рецепторы). Снижение экспрессии PGC-1 $\alpha$  связано с прогрессией механизмов хронического асептического воспаления [4,22]. Экспрессия сукцинатного рецептора SUCNR1 была наиболее выраженной у средневозрастных 6-месячных крыс и снижалась в группе старых 18-месячных особей на 20% (рис. 1Ж). В разных возрастных группах базовый уровень экспрессии маркера активности SUCNR1 фактора роста эндотелия сосудов VEGF [9] отражал сходную с сукцинатным рецептором возрастную динамику и был снижен на 20% у старых крыс в сравнении со средневозрастными крысами (рис. 1З).

Хронический иммобилизационный стресс вызывал увеличение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  у животных трех возрастных групп, однако у 3-х и 6-и месячных животных содержание воспалительных цитокинов возвращалось к базовым значениям на 5-й день стрессирования (рис. 1А, Б), что было сопряжено с увеличением уровня экспрессии IL-10, TGF- $\beta$ 1, ГК, PGC1 $\alpha$  и SUCNR1 (рис. 1В-Е). У старых 18-месячных животных уровень экспрессии воспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  прогрессивно увеличивался в ходе хронического иммобилизационного стресса (на 40% и 30% соответственно после 5-го стресс-сеанса), что происходило сопряженно с уменьшением содержания противовоспалительных цитокинов TGF- $\beta$ 1 и IL-10 (на 20% и 30% соответственно) (рис. 1В, Г), супрессией ГР и PGC1 $\alpha$  (на 20% и 40%) (рис. 1Д, Е).

В условиях хронической иммобилизации в КГМ стареющих крыс в отличие от молодых и средневозрастных животных происходило снижение экспрессии SUCNR1 (рис. 1Ж). В целом, полученные данные свидетельствуют о возрастзависимом снижении эффективности сукцинат-продуцирующих механизмов и сукцинат-зависимых путей адаптации к стрессорному воздействию [23].



**Рис.1.** Динамика экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  (А), TNF- $\alpha$  (Б), иммуносупрессивных цитокинов TGF- $\beta$ 1 (В), IL-10 (Г), глюкокортикоидных рецепторов (ГР) (Д), транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  (Е), сукцинатного рецептора SUCNR1 (Ж), фактора роста эндотелия сосудов VEGF (З) в коре головного мозга молодых (3-месячных), среднего возрастных (6-месячных), старых (18-месячных) крыс на протяжении 5-дневного иммобилизационного стресса и при курсовом введении ЭМГП сукцината старым крысам (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 5 дней, за 15 мин до стрессирования). \* – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ( $p < 0.01$ ).  $\Delta$  – данные отличаются от группы молодых крыс в соответствующем временном периоде ( $p < 0.01$ ).  $\blacktriangle$  – данные отличаются от группы среднего возрастных крыс в соответствующем временном периоде ( $p < 0.01$ ). ОДЕ – относительные денситометрические единицы.

Введение ЭМГП сукцината старым крысам перед каждым эпизодом иммобилизации ограничивало стресс-индуцированную экспрессию воспалительных цитокинов на протяжении курса стрессирования и предотвращало снижение экспрессии иммуносупрессорных цитокинов (рис. 1А-Г). Введение ЭМГП сукцината отменяло стрессорную супрессию GR, PGC1 $\alpha$ , SUCNR1 в КГМ старых крыс (рис. 1Д-З). Курсовое введение ЭМГП гидрохлорида перед каждым стрессированием не оказывало значимого влияния на определяемые параметры, что указывает на ключевую роль сукцината в ограничении стресс-индуцированного нейровоспаления в КГМ старых крыс. Противовоспалительные механизмы сукцината могут быть SUCNR1-опосредованными и не связанными с SUCNR1 [8]. Известно, что сукцинат активирует экспрессию генов иммунной функции M2-фенотипа макрофагов и подавляет гены M1-фенотипа через SUCNR1- и Gq-опосредованную передачу сигналов [7]. Важно отметить, что в условиях стресса (гипоксии) сукцинат через стадию восстановления до янтарного полуальдегида является предшественником  $\gamma$ -гидроксимасляной кислоты (ГОМК), которая активирует ГАМКВ-рецепторы, вызывает индукцию K<sup>+</sup>-проводимости в микроглие и ослабляет глутамат-индуцированную воспалительную микроглиальную активацию. ГОМК, воздействуя на пресинаптические ГАМКВ-рецепторы, подавляет глутамат-опосредованные синаптические ответы (антиглутаматергическое действие) [24].

**Заключение.** Хронический стресс вызывает воспалительно-дегенеративные изменения в лимбических структурах головного мозга, провоцирует тяжелую нейродисфункцию в старческом возрасте и прогрессию нейродегенеративных патологий. Представленная работа впервые продемонстрировала вовлеченность сукцинат/SUCNR-сигнализации в ограничение стресс-индуцированного нейровоспаления в КГМ старых крыс. Стимуляция сукцинат/SUCNR1-сигнализации является перспективным подходом к коррекции стресс-индуцированной и возраст-ассоциированной гиперактивации ГГН-оси как центрального механизма в развитии хронического асептического нейровоспаления.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Franceschi C., Campisi J. // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2014. 69(S1): S4-9.
2. Thompson M.E., Fox S.A., Berghanel A. et al. // PNAS. 2020. 117(15): 8424-30.
3. Canet G., Chevallier N., Zussy C. et al. // Front. Neurosci. 2018. 12: 739.
4. Choi G.E., Han H.J. // Neurobiol. Dis. 2021. 152: 105301.
5. Krzaga S., Kakinuma Y. // Brain Behav. Immun. Health. 2020. 7:100111.
6. Krzak G., Willis C., Smith J. et al. // Trends Immunol. 2021. 42(1): 45-58.
7. Trauelsen M., Hiron T.K., Lin D., et al. // Cell Reports. 2021. 35: 109246.
8. Harber K.J., Goede K.E., Verberk S.G.S. et al. // Metabolites. 2020. 10: 372.
9. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2014. 34: 285-93.

10. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л. и др. // Ж. Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2020. 120(1): 62-9.
11. Cherif H., Duhamel F., Cecyrye B. et al. // PLoS Biol. 2018. 16(5): e2003619.
12. Jin Y., Zhang S.S. // Yao Xue Xue Bao. 1980. 15: 761-3.
13. Yue W., Liu Y.X., Zang D.L. et al. // Acta Pharmacol. Sin. 2002. 23: 847-50.
14. Chen S.W., Xin Q., Kong W.X. et al. // Life Sci. 2003. 3: 3257-64.
15. Kirova Y.I., Shakova F.M., Voronina T.A. // Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol. 2021. 15(4): 356-64.
16. Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. // Пат. Физиол. Эксп. Тер. 2022. 66(1): 4-16.
17. Atrooz F., Alkadhi K.A., Salim S. // Curr. Res. Neurobiol. 2021. 2: 100013
18. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J. et al. // MethodsX. 2015. 440-5.
19. Candlish M., Hefendehl J.K. // Front. Neurol. 2021. 12: 660720.
20. Bereshchenko O., Bruscoli S., Riccardi C. // Front. Immunol. 2018. 9:1332.
21. Madalena K., Lerch J.K. // Neural Plasticity. 2017. 2017:1-8.
22. Rius-Perez S., Torres-Cuevas I., Millan I. et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2020. 2020: 1452696.
23. Chen T.T., Maevsky E.I., Uchitel M.L. // Front. Endocrinol. 2015. 6: 1-11.
24. Kamal R.M., Noorden M.S., Franzek E. et al. // Neuropsychobiology. 2016. 73: 65-80.

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ КРЫС НА МОДЕЛИ 6-ОНДА-ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

*Успенко Н.И.<sup>1,2</sup>, Мосенцов А.А.<sup>1</sup>, Хмиль Н.В.<sup>1</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1</sup>,  
Хундерякова Н.В.<sup>1</sup>, Медведева В.П.<sup>1,2</sup>, Мальков А.Е.<sup>1</sup>,  
Кичигина В.Ф.<sup>1</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт,  
Пушино, Россия

**Введение.** Болезнь Паркинсона (БП) это нейродегенеративное заболевание, вызванное прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции и полосатом теле, что приводит к дефициту дофамина. Снижение уровня дофамина приводит к появлению двигательных расстройств и немоторных симптомов, таких как апатия, ангедония, депрессия, когнитивная дисфункция и нарушение сна. Исследования на различных животных моделях БП показывают, что митохондриальная дисфункция может возникать на ранней стадии патогенеза БП и, по-видимому, является

широко распространенным признаком как спорадических, так и наследственных форм БП. Митохондриальные аномалии, связанные с этим заболеванием, включают нарушения в работе электрон-транспортной цепи митохондрий, изменения их морфологии и динамики, мутации митохондриальной ДНК и аномалии кальциевого гомеостаза. Дисфункция митохондрий может привести к снижению выработки энергии, образованию активных форм кислорода (АФК) и индукции стресс-индуцированного апоптоза. Развитие окислительного стресса в результате избыточной продукции АФК является одним из предполагаемых механизмов гибели дофаминергических нейронов при БП. Уридин является предшественником УДФ, природного активатора митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митокАТФ). Ранее в нашей лаборатории было показано, что активация канала путём введения уридина оказывает выраженный защитный эффект на ткани организма при развитии окислительного стресса при инфаркте миокарда, воспалении и других модельных заболеваниях [1-3]. В настоящей работе была предпринята попытка использования уридина при БП.

**Материалы и методы:** Исследование проведено на самцах крыс (n=25) линии Вистар, весом 280-320 г, содержащихся на базе ИТЭБ РАН, с соблюдением правил Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными. Моделирование патологии проводилось стереотаксическим введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA) в черную субстанцию головного мозга крысы (6 мкг на полушарие). После инъекции 6-OHDA попадает в дофаминергические нейроны через переносчики дофамина и норадреналина. Попав внутрь дофаминергических нейронов, 6-OHDA инициирует увеличение АФК и окисление дофамина с последующей его деградацией. Это ведёт к дегенерацию нейронов, воспалению и, как следствие, выраженной митохондриальной дисфункции.

Для коррекции нарушений в работе использовался уридин, который вводили внутрибрюшинно в концентрации 30 мг/кг веса животного. Для подтверждения вовлеченности канала в формирование защитного эффекта использовался специфический ингибитор митокАТФ канала, 5-гидроксидеканоат (5-HD, 5 мг/кг, внутрибрюшинно).

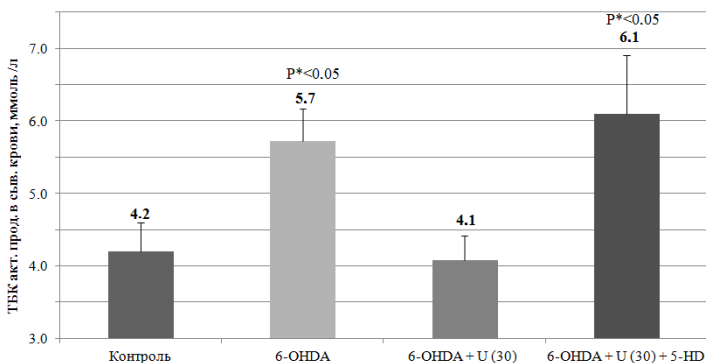
Тестирования проводились через 3 недели после стереотаксического введения 6-OHDA. Проверка двигательной активности проводилась с использованием поведенческого теста «Ротарод». Скорость образования  $H_2O_2$  в митохондриях мозга измерялась с использованием флюорисцентного индикатора Amplex red. Уровень ТБК активных продуктов перекисного окисления липидов определяли в митохондриях и сыворотке крови, спектрофотометрически используя набор «ТБК-АГАТ». Структурные изменения в ткани мозга изучали

методом трансмиссионной электронной микроскопии. Определение активности СДГ и ЛДГ в лимфоцитах на мазке проводили цитобиохимическим методом. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel-2007 и Statistica 10.0. Оценка значимости различий данных между группами, проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при значениях  $*p < 0.05$

**Результаты.** Послеоперационный период за животными проводилось ежедневное наблюдение для оценки их веса и двигательной подвижности. Исходя из полученных данных введение 6-OHDA приводило к значительной потере веса на 35% в опытной группе, по сравнению с контролем. Для оценки двигательной активности на 22 сутки после введения нейротоксина проводился тест «Ротарод». Введение нейротоксина в опытной группе приводило к снижению времени нахождения животных на вращающемся стержне на 70% по отношению к группе контроль. При совместном введении с уридином время нахождения животного на стержне возрастало и приближалось к контрольным значениям. Введение специфического ингибитора митоКАТФ канала 5-HD не оказало значимого влияния на время нахождения животных на вращающемся стержне.

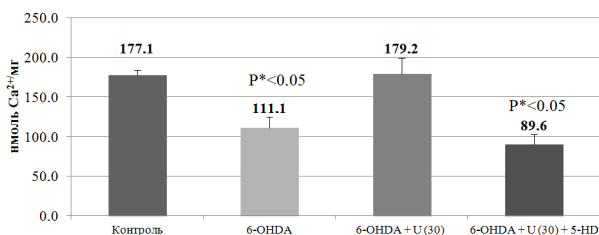
Как известно, окислительное дезаминирование 6-OHDA сопровождается образованием перекиси водорода, которая может стать причиной повреждения белковых структур и внутриклеточных компартментов, что в последствии может сказаться на работе нейронов и проявлении двигательных нарушений. В данной работе была определена скорость образования перекиси водорода в системе с Amplex Red и пероксидазой хрена на субстратах первого комплекса цепи переноса электронов. Было обнаружено увеличение скорости в опытной группе на 23% по отношению к группе контроль. Введение уридина совместно с нейротоксином приводило к снижению этого показателя даже ниже, чем в контроле. Введение 5-HD совместно с уридином незначимо увеличивает скорость образования перекиси водорода. Также в данной работе было определено содержание продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях (МДА). В группе с нейротоксином этот показатель был выше на 18% чем в контрольной группе. Введение уридина приводило к снижению содержания продуктов МДА до уровня ниже контроля так же как и в случае со скоростью образования перекиси водорода. Измерение МДА активных продуктов в сыворотке крови показало увеличение на 37% в группе у БП крыс, а лечение уридином снижало этот показатель до контрольного уровня, введение ингибитора 5-HD леченым животным нивелировало эффект уридина и приводило к увеличению содержания продуктов МДА на 45% (рис. 1).





**Рис. 1.** Сравнение ТБК активности сыворотки крови, определяемой с помощью диагностического набора «ТБК-АГАТ» крыс контрольной группы, модельной группы БП (повышена на 37%,  $P < 0.05$ ) и модельной группы БП с введением уридина (30 мг/кг) (снизилось до уровня контроля) и уридина вместе с 5-гидроксидеканоатом (5 мг/кг) (достоверно повысилась на 45%,  $P < 0.05$ ).

Изучение показателя кальциевой ёмкости митохондрий головного мозга крыс показало, что моделирование болезни Паркинсона с помощью 6-OHDA у крыс снижает кальциевую ёмкость митохондрий на 63% по отношению к контролю. Введение уридина в концентрации 30 мг/кг совместно с 6-OHDA животным, увеличивает кальциевую ёмкость митохондрий до уровня контроля. Применение блокатора митоКАТФ канала 5-HD полностью снимает положительный эффект уридина (рис. 2).



**Рис. 2.** Сравнение кальциевой ёмкости митохондрий мозга крыс контрольной группы, модельной группы БП и модельной группы БП с введением уридина (30 мг/кг) и уридина вместе с 5-гидроксидеканоатом (5-HD, 5 мг/кг).

Цитобиохимическое определение активности ключевого фермента митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в иммобилизованных лимфоцитах крови на мазке у БП крыс достоверных отличий не показало. При введении уридина больным животным активность СДГ повысилась относительно контроля на 80% (табл. 1), применение 5-HD достоверно снизило положительный ответ уридина ниже контроля. Измерение активности цитозольного фермента гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

в лимфоцитах крови на мазке у крыс с БП достоверно увеличилось на 35% от контрольной группы, а лечение уридином снизило эту активацию до уровня контрольных значений. Введение ингибитора 5-HD сняло эффект уридина, повысив уровень ЛДГ на 37% до уровня при патологии. Таким образом, у крыс с БП выявлено преобладание гликолиза над дыханием митохондрий в лимфоцитах крови, а введение уридина приводило к усилению митохондриального дыхания на 80% и снижению гликолиза. Введение 5-HD снимало эффект уридина в митохондриях и цитозоле лимфоцитов.

**Табл. 1.** Сравнение активностей СДГ и ЛДГ в лимфоцитах крови на мазке при ЦБХ определении в группах: контроль, модельной группы БП (6-OHDA) и модельной группы БП с введением уридина (6-OHDA+U(30), 30 мг/кг) и уридина вместе с 5-гидроксидеканоатом (6-OHDA+U(30)+5-HD, 5 мг/кг), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

Группы	Активность СДГ(у.е.)	Активность ЛДГ(у.е.)
Контроль	1.14	1.78
6 OHDA	1.37	2.41*
6-OHDA+U(30)	1.82	1.70**
6-OHDA+U(30)+5-HD	1.00	2.44*

Между показателями гликолиза (активности ЛДГ) в лимфоцитах и окислительного стресса (ТБК-активные продукты в сыворотке) была выявлена прямая положительная корреляция с коэффициентом  $r = 0.99$ . У животных с синдромом БП активность ЛДГ повысилась на 37% и количество ТБК-активных продуктов увеличилось на 35%. Лечение уридином снизило оба показателя до значений контрольной группы, 5-HD полностью снял эффект уридина в лимфоцитах и в сыворотке.

**Заключение.** В рамках проведенного исследования на модели болезни Паркинсона, индуцированной введением нейротоксина 6-OHDA, было показано, что уридин в концентрации 30 мг/кг предотвращает потерю веса животными, восстанавливает двигательную активность, снижает скорость образования пероксида водорода и уровень перекисного окисления липидов, восстанавливает кальциевую ёмкость митохондрий мозга крыс, а также способствует усилению митохондриального дыхания на фоне снижению активности цитозольного фермента гликолиза (ЛДГ).

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00441.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Mironova G.D., Negoda A., Marinov B.S. et al. // J. Biol. Chem. 2004. 279: 32562-8.*
2. *Mironova D., Khrenov M.O., Talanov E.Y. et al. // Arch Biochem Biophys. 2018. 654: 70-76.*
3. *Krylova I.B., Selina E.N., Bulion V.V. et al. // Sci. Rep. 2021. 11(1): 16999.*

## НАРУШЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ С МУТАЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

*Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В.*

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

**Введение.** Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, вторым по распространенности после болезни Альцгеймера [1]. В его основе лежит селективная гибель дофаминергических нейронов в среднем мозге. Несмотря на многочисленные исследования точная причина гибели клеток до сих пор не установлена.

Безусловно, существует огромная потребность в использовании различных экспериментальных моделей, которые могут повторять признаки развития БП. В качестве объектов для исследования БП активно используют животные модели и клеточные линии. Основными моделями *in vivo* являются грызуны. Также исследования проводят на плодовых мушках *Drosophila melanogaster*, нематодах *Caenorhabditis elegans*, дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, рыбах *Danio rerio*, нечеловекообразных приматах. В качестве моделей *in vitro* используют первичные культуры головного мозга, в основном грызунов, пересеваемые клеточные линии, например, нейробластома, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки). Существуют токсические модели, которые создаются путем обработки клеток или животных токсинами, такими как MPP<sup>+</sup>, 6-OHDA, ротенон, паракват. Генетические или наследственные модели основаны на изменении экспрессии генов, принимающих участие в развитии БП. К ним относятся: мутации в гене альфа-синуклеина, в генах, кодирующие белки, связанные с митохондриальными функциями: PINK1, Parkin, DJ-1, LRRK2, и др. [2].

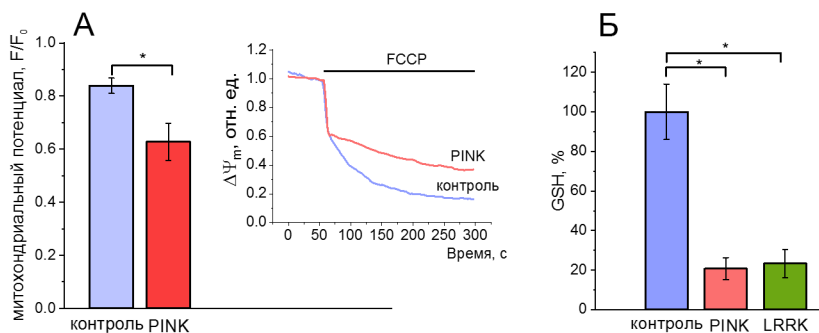
До сих пор остается дискуссионным вопрос о молекулярных основах нейродегенерации, возникающей при БП. Известно, что при этом происходят нарушения митохондриальных функций, накапливаются токсические агрегаты альфа-синуклеина, также возникают дисфункции эндоплазматического ретикулула и кальциевого гомеостаза, что приводит к апоптотической и неапоптотической программируемой гибели клеток [3-5].

Одной из лучших клеточных наследственных моделей являются iPS-клетки. Однако методики их получения непросты и дорогостоящи, поэтому остро стоит вопрос о поиске более простых моделей. В связи с

этим **целью** данной работой было определить, возможно ли использовать фибробласты кожи человека с мутациями, полученные от пациентов с БП, в качестве модели БП. Для этого мы оценили параметры, связанные с функциями митохондрий, поскольку при БП значимые нарушения происходят в митохондриях.

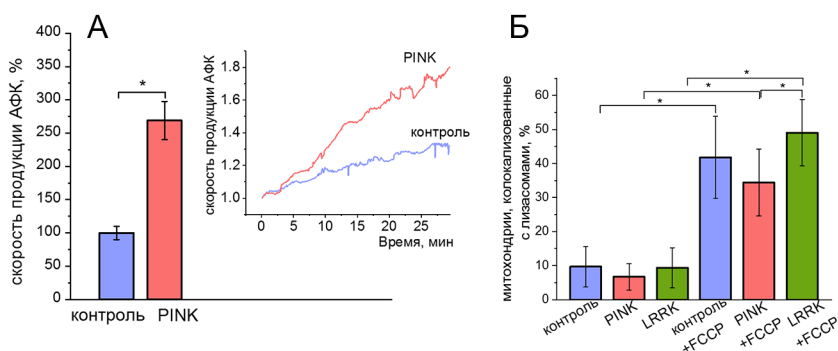
**Материалы и методы.** В работе мы использовали фибробласты человека с мутациями в генах *PINK1* и *LRRK2*, а также контрольные клетки, полученные от здоровых доноров, применяли методы конфокальной и флуоресцентной микроскопии, а также ПЦР-анализ в реальном времени для оценки экспрессии генов-маркеров контроля качества митохондрий и клеточной гибели.

**Результаты и обсуждение.** Мы измерили уровень митохондриального потенциала, оценивая флуоресцентный сигнал от клеток, покрашенных зондом TMRM, в ответ на добавку деполяризующего агента FCCP (5 мкМ). В результате было показано, что в клетках с мутацией *PINK* наблюдалась низкая амплитуда ответа на FCCP, свидетельствующая о пониженном митохондриальном потенциале в мутантных клетках (рис. 1А). Уровень восстановленного глутатиона определяли по интенсивности флуоресценции монохлорбимана (MCB) и показали, что уровень восстановленного глутатиона в клетках с мутациями *PINK* и *LRRK* существенно ниже, чем в контрольных фибробластах (рис. 1Б). Полученные данные говорят, о нарушениях в митохондриях мутантных клеток.



**Рис. 1.** А. Репрезентативные кривые изменения митохондриального потенциала и амплитуды изменения митохондриального потенциала в ответ на добавку 5 мкМ FCCP в культурах фибробластов. Базальный уровень флуоресценции принят за 1. Б. Уровень восстановленного глутатиона в культурах фибробластов. Базальный уровень флуоресценции принят за 100%. \*  $p < 0.05$ , относительно контрольных клеток фибробластов.

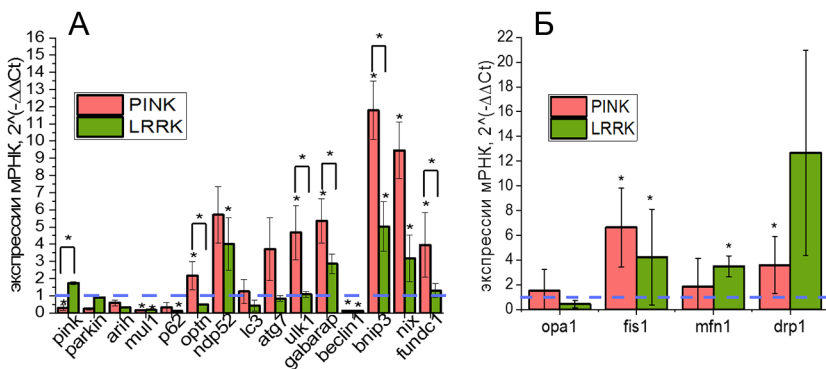
Известно, что нейродегенерация во время БП сопровождается окислительным стрессом [6]. В связи с этим мы оценили скорость продукции активных форм кислорода (АФК) в митохондриях. Для этого клетки инкубировали с флуоресцентным красителем MitoSOX Red. Поскольку в покое клетки флуоресценция не увеличивалась, клетки подвергали стрессовому воздействию в виде обработки 50 мкМ перекиси водорода. На рис. 2А представлены репрезентативные кривые изменения флуоресценции индикаторов продукции АФК и диаграммы, показывающие относительную скорость продукции АФК. Показано, что продукция АФК митохондриями была повышена в культурах с мутацией PINK относительно контроля более чем в 2.5 раза, что свидетельствует о нарушении состояния митохондрий.



**Рис. 2.** А. Репрезентативные кривые увеличения флуоресценции MitoSOX Red и значения скорости митохондриальной АФК-продукции в культурах фибробластов, подвергнутых двухчасовому действию 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Б. Процент митохондрий, колокализованных с лизосомами. \*  $p < 0.05$ , относительно контрольной культуры фибробластов.

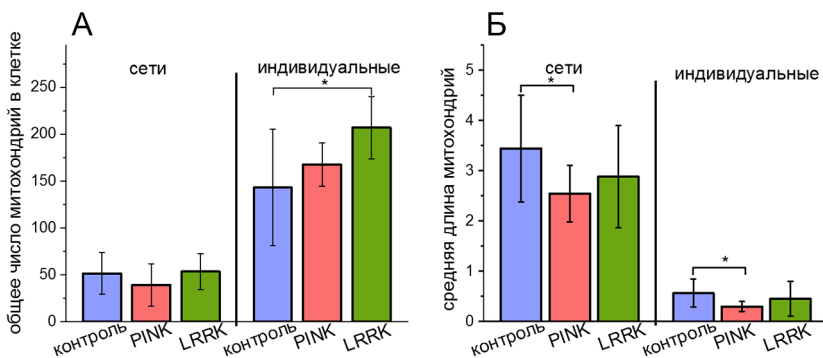
Ранее было показано, что одной из причин гибели клеток при БП является нарушение контроля качества митохондрий, а именно подавление процесса селективного вывода митохондрий из клетки – митофагии, и изменение динамики митохондриальной сети (слияние и деление митохондрий) [7]. Мы оценили уровень митофагии с помощью метода измерения степени колокализации митохондрий и лизосом [8]. Было показано, что базальная митофагия в культурах фибробластов с мутациями не отличался от таковой в контрольных клетках. При активации митофагии с помощью FCCP (известного индуктора этого процесса [9]) уровень митофагии увеличивался во всех клетках (рис. 2Б). При оценке экспрессии мРНК генов-маркеров митофагии, было выявлено увеличение экспрессии некоторых генов, таких как *Ndp52*, *Bnip3*, *Nix*,

*Fundc1* в мутантных клетках относительно контрольных, что указывает на альтернативный рецептор-опосредованный путь митоза, который считается наиболее распространенным при стрессовых воздействиях и гипоксии [10] (рис. 3А).



**Рис. 3.** Уровни экспрессии мРНК генов, связанных с процессом мито/аутофагии (А) и с митохондриальной динамикой (Б) в культурах фибробластов. Результаты представлены относительно референсного гена *Eef1a1* и контрольной культуры фибробластов (пунктирная линия – контроль). \*  $p < 0.05$  относительно контроля.

Для оценки морфологии и динамики митохондриальной сети клетки прокрашивали флуоресцентными зондами Mitotracker Green и TMRM, получали микрофотографии на конфокальном микроскопе и обрабатывали их специально разработанным плагином и программой, что позволило оценить морфологию митохондриальной сети по таким параметрам, как средняя длина, количество и площадь и отдельных митохондрий и всей сети [11]. Было показано, что для мутации LRRK характерно увеличение индивидуальных (содержащих менее одной ветви и связи) митохондрий в клетке по сравнению с контрольными фибробластами, а уменьшение средней длины митохондрий как в составе митохондриальных сетей, так и для индивидуальных митохондрий характерно для клеток с мутацией PINK1. Поскольку митохондрии могут отсоединяться от митохондриальной сети для последующей деградации посредством митоза, данный факт может говорить об увеличении митоза в клетках, либо может быть связан с нарушением слияния митохондрий (рис. 4А, Б). Данные подтверждены анализом экспрессии связанных с митохондриальной динамикой генов, в результате которого видно, что увеличивается уровень мРНК *Fis1* и *Drp1*, отвечающих за митохондриальное деление (рис. 3Б).



**Рис. 4.** Параметры морфологии митохондриальной сети. А. Количество митохондриальных сетей и индивидуальных митохондрий в фибробластах. Б. Средняя длина митохондрий в митохондриальной сети и индивидуальных митохондрий фибробластов. \*  $p < 0.05$ , относительно контрольной культуры фибробластов.

С помощью метода двойного окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst и Propidium Iodide была оценена жизнеспособность клеток в культурах фибробластов: количество мертвых клеток значимо не отличалось в контрольной культуре и в мутантных клетках. Исследование генов-маркеров апоптоза выявило увеличение экспрессии лишь нескольких генов.

Также мы провели измерения внутриклеточного уровня рН, изменения которого способно активировать митофагию в клетках [12]. Итак, уровень внутриклеточного рН, измеренный по сигналу флуоресцентного красителя BCECF, был понижен в клетках PINK относительно контрольных фибробластов.

В ходе работы, сравнивая контрольные фибробласты и клетки с мутациями в генах *PINK1* и *LRRK2*, было определено, что в мутантных клетках понижен митохондриальный потенциал, уровень глутатиона, а также увеличена скорость продукции АФК. Базальная митофагия не увеличена, однако динамика митохондриальной сети отличается в мутантных клетках. Уровень внутриклеточного рН понижен в клетках с мутациями. Сопоставляя полученные данные с ранее исследованными параметрами на токсической модели [13], следует отметить, что в мутантных фибробластах, как и в токсической модели наблюдаются нарушения, связанные с митохондриальными функциями (митохондриальный потенциал, уровень глутатиона, контроль качества митохондрий, продукция АФК), чего не выявлено в контрольных культурах фибробластов. Этот факт позволяет нам использовать мутантные фибробласты в качестве модели БП в наших экспериментах, связанных с исследованием контроля качества митохондрий при БП.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 22-24-01043 «Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона» с использованием оборудования ЦКП ПНЦБИ РАН, в частности УНУ № 445679.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rocca W.A. // Lancet Neurol. 2018. 17(11): 928-9.
2. Spatola M., Wider C. // Parkinsonism Relat. Disord. 2014. 20(1): S35-8.
3. Schulz-Schaeffer W.J. // Acta Neuropathol. 2010. 120.:131-43.
4. Winklhofer K.F., Haass C. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. 1802(1): 29-44.
5. Zaichick S.V., McGrath M.M., Caraveo G. // Dis. Model. Mech. 2017. 10(5): 519-35.
6. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. // J. Parkinsons Dis. 2013. 3(4): 461-91.
7. Ashrafi G., Schwarz T.L. // Cell Death Differ. 2013. 20(1): 31-42.
8. Fedotova E.I., Dolgacheva L.P., Abramov A.Y., Berezhnov A.V. // Mol. Neurobiol. 2022. 59(1): 177-90.
9. Deas E., Wood N.W., Plun-Favreau H. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. 1813(4): 623-33.
10. Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A. et al. // J. Biol. Chem. 2008. 283(16): 10892-903.
11. Крицкая К.А., Ларюшкин Д.П., Федотова Е.И. и др. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Бережнов А.В., Зинченко В.П. (Ред.). Пятый формат, Серпухов, 2021. 1:333-6.
12. Berezhnov A.V., Soutar M.P., Fedotova E.I. et al. // J. Biol. Chem. 2016. 291(16): 8701-8.
13. Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В. // см. в настоящем Сборнике.

## ВЛИЯНИЕ ЗАКИСЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ В ТОКСИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

*Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В.*

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

**Введение.** В основе болезни Паркинсона (БП) лежит селективная гибель дофаминергических нейронов в среднем мозге. Понимание причин гибели этих клеток является первым шагом к разработке средств нейропротекции и излечению или замедлению течения болезни, не имеющей в настоящее время эффективных способов лечения [1]. Хотя точные механизмы повреждения нейронов остаются неясными,



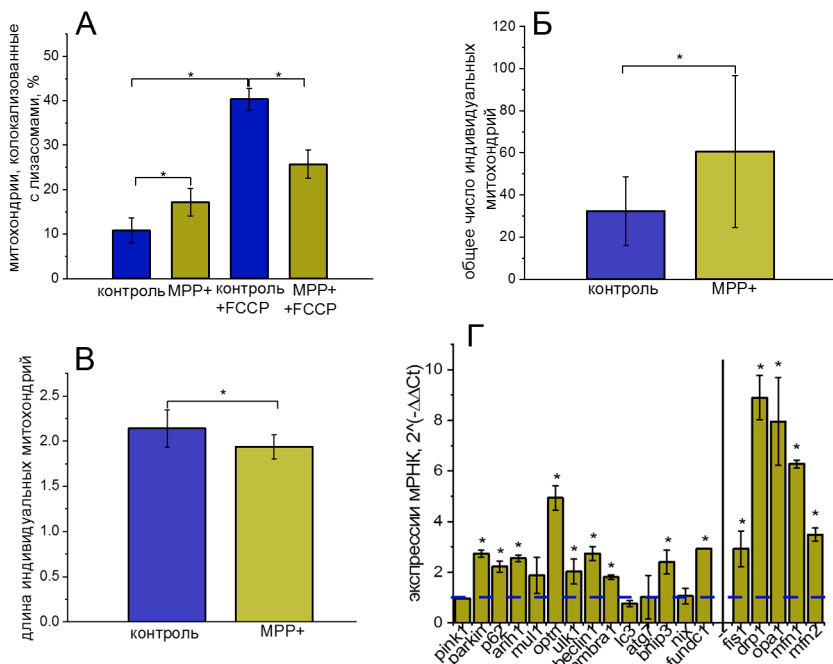
аномальное функционирование митохондрий, по-видимому, является конвергентной точкой в процессах гибели клеток [2]. В качестве нарушений, сопутствующих повреждению митохондрий, рассматриваются накопление агрегатов альфа-синуклеина, окислительный стресс, стресс ретикулума, нарушения процессов ауто/митофагии и нарушения кальциевой сигнализации [3]. Высказаны предположения, что умеренная активация митофагии может защищать клетки от гибели в результате нарушений, связанных с БП [4]. При этом остается открытым вопрос о способах индукции этого процесса в клетках. Ранее нами было предложено, что закисление внутриклеточной среды активирует процессы аутофагии и митофагии в клетках [5], что может быть использовано в поиске терапевтических подходов для лечения БП. Так, **целью** данной работы было: оценить защитный потенциал кратковременного закисления внутриклеточной среды в токсической клеточной модели БП.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на токсической клеточной модели БП – культуре нейробластомы SH-SY5Y, обработанной нейротоксином MPP<sup>+</sup>. *Внутриклеточный pH (pH<sub>i</sub>)* измеряли с помощью флуоресцентного зонда BCECF-AM (5 мкМ, 40 мин) и многофункционального планшетного ридера Spark10M (Tecan). Для преобразования экспериментальных данных в значения pH была проведена калибровка флуоресцентного сигнала красителя [6]. *Уровень мито/аутофагии* оценивали по доле митохондрий, которые локализованы совместно с лизосомами, с помощью флуоресцентных красителей MitoTracker Green (MTG, 0.3 мкМ) и LysoTracker Red (0.1 мкМ), конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и специального макроса в ImageJ [7]. *Морфологию и динамику митохондриального ретикулума (сети)* определяли с помощью флуоресцентных зондов MTG (0.1 мкМ) и TMRM (20 нМ), конфокального микроскопа Leica TCS SP5, а также специального макроса и программы RStudio [8]. *Митохондриальные активные формы кислорода (АФК)* изучали с применением флуоресцентного зонда MitoTracker Red CM-H(2)XROS (500 нМ, 30 мин), флуоресцентной станции Leica DMI6000 B. При обработке подсчитывали скорость роста сигнала в MPP<sup>+</sup>-индуцированных клетках SH-SY5Y в процентах от скорости в контрольных клетках. *Митохондриальный потенциал* измеряли с помощью флуоресцентных зонда TMRM (50 нМ), конфокального микроскопа Leica TCS SP5. При этом падение флуоресценции соответствовало деэнергизации митохондрий, оценивалась амплитуда ответа на 5 мкМ FCCP. *Уровень NADH* определяли по аутофлуоресценции при возбуждении в  $340 \pm 5$  нМ и регистрации в  $460 \pm 10$  нМ на флуоресцентной станции Carl Zeiss [9]. Вычисляли окислительно-восстановительный индекс NADH: уровень сигнала в

процентах от разницы между минимальным (ответ на 2 мкМ FCCP) и максимальным (ответ на 5 мМ NaCN) сигналами, а также базальный уровень и пул NADH (разница сигнала между базальным значением и сигналом на FCCP). *Уровень восстановленного глутатиона* оценивали по интенсивности флуоресценции монохлорбимана (MCB, 50 мкМ, 30 мин) с помощью флуоресцентной станции Leica DMI6000B. *Жизнеспособность* клеток исследовали методом двойного окрашивания Hoechst 33342 и Propidium Iodide с помощью флуоресцентной станции Leica DMI6000 B и представляли в виде процента нежизнеспособных и апоптотических клеток от всех клеток в поле зрения. *Оценку экспрессии мРНК* генов-маркеров мито/аутофагии, динамики митохондриальной сети и клеточной гибели проводили с помощью ПЦР-анализа в реальном времени с использованием qPCRmix-HS SYBR и амплификатора ДТЛайт (ДНК-Технология), предварительно выделив тотальную РНК (ExtractRNA) и проведя синтез кДНК (MMLV RT). Уровень исследуемых генов определяли по отношению к референсному гену *Pgk1* (кодирует фосфоглицераткиназу 1) по формуле:  $N = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  [10].

**Результаты и обсуждение.** В начале мы измерили уровень рН<sub>i</sub> в культуре нейробластомы, поскольку именно его изменение может приводить к запуску митофагии. Так, мы показали, что значение рН в клетках составило  $-7.16 \pm 0.12$ . При обработке клеток 500 мкМ MPP<sup>+</sup> в течение 24-48 ч (для создания токсической модели БП) рН<sub>i</sub> значительно не изменялся  $-7.09 \pm 0.08$ . Также при добавлении MPP<sup>+</sup> непосредственно перед экспериментом значение рН<sub>i</sub> было  $7.13 \pm 0.03$ .

Далее было изучено изменение контроля качества митохондрий (степень митофагии и изменение динамики митохондриальной сети) в клетках. При исследовании уровня базальной митофагии на культуре клеток нейробластомы было показано, что значение уровня колокализированных митохондрий составило  $10.84 \pm 1.86\%$  в контрольной культуре и  $21.43 \pm 2.05\%$  в MPP<sup>+</sup>-индуцированной модели, что, по-видимому, связано с оказываемым ингибирующим действием MPP<sup>+</sup> на комплекс I ЭТЦ и соответствующим падением митохондриального потенциала. При обработке культур 10 мкМ FCCP, который, как известно, запускает митофагию [11], это значение увеличивалось до  $40.32 \pm 2.45\%$  в контрольной культуре и до  $25.70 \pm 3.15\%$  в токсической модели, что свидетельствует об активации митофагии в клетках (рис. 1А). Кроме того, при обработке клеток SH-SY5Y MPP<sup>+</sup> увеличилась экспрессия мРНК *Parkin*, *p62*, *Opteneurin*, *Ulk1*, *Beclin*, *Snip3*, *Fundc1* по сравнению с контрольной культурой (рис. 1Г), что говорит о том, что митофагия в клетках токсической модели активирована.



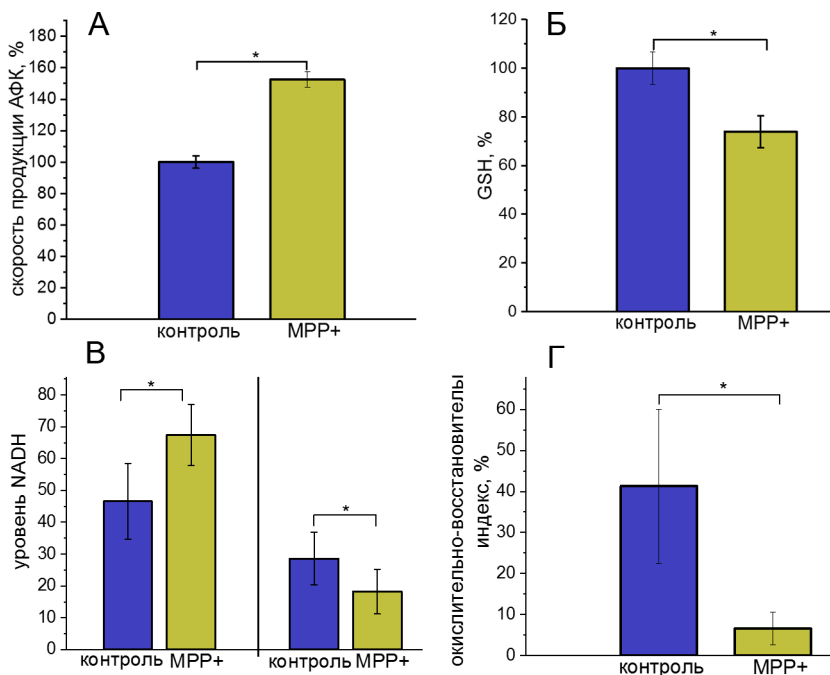
**Рис. 1.** Оценка контроля качества митохондрий в культуре клеток SH-SY5Y. А. Процент митохондрий, колокализованных с лизосомами. Б. Общее количество индивидуальных митохондрий в клетках. В. Относительная длина индивидуальных митохондрий. Г. Уровни экспрессии мРНК генов, связанных с митофагией и митохондриальной динамикой. Результаты представлены относительно *Pgk* и необработанных клеток (пунктирная линия – контроль). \* –  $p < 0.05$  относительно клеток без обработки (контроль).

Затем были проведены эксперименты для оценки морфологии и динамики митохондриальной сети, которые могут быть изменены в клетках при БП. В ходе работы были оценены несколько параметров, такие как площадь и количество митохондриальных сетей, количество и средняя длина индивидуальных митохондрий в клетке, а также суммарное и среднее количество связей и ветвей (плотность), средняя длина митохондрий в митохондриальных сетях. Так, в токсической модели нейробластомы площадь митохондриальной сети, как и количество митохондриальных сетей в клетке не изменялось. Также не наблюдалось изменение суммарного и среднего количества связей и ветвей в митохондриальной сети. При этом, в культуре SH-SY5Y наблюдалось увеличение числа индивидуальных митохондрий при обработке клеток

MPP<sup>+</sup> ( $60.58 \pm 36.06$ ) относительно контроля ( $32.33 \pm 16.33$ ) (рис. 1Б). Поскольку митохондрии могут отсоединяться от митохондриальной сети для последующей деградации посредством митофагии, данный факт может говорить об увеличении митофагии в клетках, либо может быть связан с нарушением слияния митохондрий в ответ на стресс, вызванный нейротоксином. Также для клеток SH-SY5Y, обработанных MPP<sup>+</sup>, характерно значимое уменьшение относительной длины митохондрий ( $1.94 \pm 0.13$ ) по сравнению с контрольной культурой ( $2.14 \pm 0.20$ ) (рис. 1В). Это может говорить о набухании фрагментированных митохондрий под действием стресса или нейротоксина. Данные подтверждены анализом экспрессии генов, в результате которого увеличивается уровень мРНК генов, таких как *Fis*, *Drp*, *Opa*, *Mfn*, которые связаны с митохондриальной динамикой (рис. 1Г).

Далее мы провели измерения продукции митохондриальных АФК, поскольку известно, что БП сопровождается окислительным стрессом [12]. Так как в покоящихся клетках не было выявлено значимого увеличения флуоресценции, их подвергали стрессовому воздействию в виде обработки 50 мкМ перекиси водорода. В результате мы показали, что в MPP<sup>+</sup>-индуцированной модели БП скорость продукции АФК была увеличена ( $152 \pm 5\%$ ) относительно контрольной культуры SH-SY5Y (100%) (рис. 2А).

Известно, что изменения митохондриальной динамики взаимосвязаны с биоэнергетическим состоянием клеток. В связи с этим мы исследовали такие параметры митохондрий, как митохондриальный потенциал, уровень NADH и уровень восстановленного глутатиона. Было получено, что обработка клеток MPP<sup>+</sup>, приводит к значительному снижению митохондриального потенциала: в контроле сигнал в ответ на FCCP составил  $0.41 \pm 0.01$ , а в токсической модели –  $0.10 \pm 0.01$ . Значение базального уровня NADH в MPP<sup>+</sup>-индуцированной культуре SH-SY5Y составило  $67.41 \pm 9.65$ , тогда как в контроле –  $46.55 \pm 11.98$ , общий пул NADH также был значительно меньше в клетках, обработанных MPP<sup>+</sup> ( $18.22 \pm 7.01$ ) по сравнению с контролем ( $28.58 \pm 8.25$ ), как и окислительно-восстановительный индекс NADH: в клетках токсической модели –  $6.6 \pm 3.7\%$ , в контрольных –  $41.3 \pm 18.7\%$  (рис. 2В, Г). Уровень восстановленного глутатиона в клетках нейробластомы, обработанных MPP<sup>+</sup>, составил  $73.89 \pm 6.49\%$ , что свидетельствует о пониженном уровне глутатиона (рис. 2Б). Таким образом, было показано, что биоэнергетика митохондрий нарушена: понижен митохондриальный потенциал, общий пул и окислительно-восстановительный индекс NADH и уровень восстановленного глутатиона в клетках токсической модели БП.



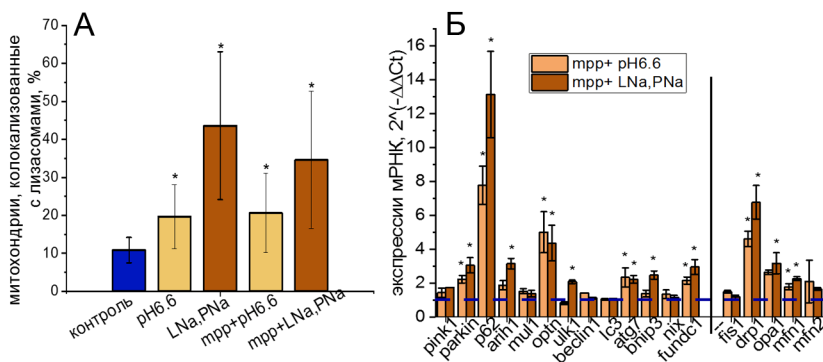
**Рис. 2.** А. Значение скорости продукции митохондриальных АФК-продукции в клетках SH-SY5Y, подвергнутых двухчасовому действию 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Б. Уровень восстановленного глутатиона. Базальный уровень флуоресценции принят за 100%. В. Изменение уровня базального NADH и общего пула NADH. Г. Изменение окислительно-восстановительного индекса NADH. \* –  $p < 0.05$ , относительно клеток без обработки (контроль).

Затем мы исследовали жизнеспособность клеток в культуре нейробластомы и определили, что количество мертвых клеток в контрольной культуре SH-SY5Y было  $4.9 \pm 1.1\%$ , тогда как это значение увеличивалось при обработке клеток  $\text{MPP}^+$  до  $10.5 \pm 2.0\%$ . В результате оценки экспрессии мРНК генов-маркеров клеточной гибели выявили значимое увеличение экспрессии апоптотических генов *caspase3*, *caspase8*.

Таким образом, в работе было показано, что в токсической  $\text{MPP}^+$ -индуцированной клеточной модели уровень внутриклеточного pH не изменялся. Однако степень митофагии в таких клетках была повышена, а также увеличено количество индивидуальных митохондрий в клетках и уменьшена их относительная длина, также наблюдались: сверхпродукция АФК, нарушения состояния митохондрий (понижены митохондриальный

потенциал, окислительно-восстановительный индекс NADH, уровень восстановленного глутатиона) по сравнению с контрольной культурой нейробластомы.

На следующем этапе работы мы исследовали, как кратковременное закисление внутриклеточной среды посредством замены внеклеточного раствора на раствор с низким значениям pH (pH 6.6 в течение 60 мин) или добавления агентов, понижающих значение pH<sub>i</sub>, таких как лактат Na и пируват Na (LNa, PNa, 10 мМ, 24 ч), влияет на внутриклеточные параметры токсической клеточной модели БП. Было выявлено, что закисление запускает ауто/митофагию, о чем свидетельствует увеличение степени колокализации митохондрий и лизосом. Так, это значение становилось  $43.60 \pm 19.47$  при обработке клеток LNa, PNa в течение 24 ч и  $19.63 \pm 8.40$  при прямом закислении среды (pH 6.6). Также в MPP<sup>+</sup>-индуцированной модели уровень митофагии становился  $34.57 \pm 18.09$  (при LNa, PNa) и  $20.61 \pm 10.46$  (при pH 6.6) (рис. 3А).



**Рис. 3.** А. Процент митохондрий, колокализованных с лизосомами, в культуре SH-SY5Y при обработке клеток LNa, PNa (10 мкМ, 24 ч) и при замене внеклеточной среды на среду с pH 6.6 (1 ч) в контрольной культуре и в токсической модели (+MPP<sup>+</sup>, 24 ч). Б. Уровни экспрессии мРНК генов, связанных с контролем качества митохондрий в MPP<sup>+</sup>-индуцированной культуре при обработке клеток LNa, PNa (10 мкМ, 24 ч) и при замене внеклеточной среды на среду с pH 6.6 (1 ч). Результаты представлены относительно *Pgk* и необработанных клеток (пунктирная линия – контроль) \* –  $p < 0.05$  относительно клеток без обработки (контроль).

Кроме того, было показано увеличение уровня экспрессии мРНК основных генов-маркеров митофагии (рис. 3Б). При изменении pH<sub>i</sub> происходит изменение митохондриальной динамики, что подтверждается методом ПЦР-анализа. При этом повышается экспрессия генов *Opal*, *Drp1*, *Mfn-1* при прямом закислении клеток и при обработке культуры LNa, PNa как в контрольных, так и в модельных клетках (рис. 3Б). Падение

митохондриального потенциала не было столь существенным во время закисления: ответ на FCCP составил  $0.26 \pm 0.01 / 0.31 \pm 0.01$ . Следует отметить, что количество мертвых клеток уменьшилось в MPP<sup>+</sup>-индуцированной культуре SH-SY5Y при закислении:  $\sim 7.00 \pm 1.00\%$ . Исследования экспрессии мРНК генов, связанных с клеточной гибелью, выявили увеличение лишь гена *caspase3*.

**Заключение.** В токсической MPP<sup>+</sup>-индуцированной клеточной модели БП наблюдаются нарушения состояния митохондрий и увеличено количество нежизнеспособных клеток по сравнению с контрольной культурой, а кратковременное закисление внутриклеточной среды активизирует процессы контроля качества митохондрий, улучшает биоэнергетическое состояние клеток, а также увеличивает уровень жизнеспособных клеток, тем самым, защищая клетки от гибели в культуре нейробластомы SH-SY5Y, обработанной нейротоксином MPP<sup>+</sup>.

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-01512-22-03 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4. с использованием оборудования ЦКП ПНЦБИ РАН, в частности УНУ № 445679.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Oertel W., Schulz J. B. // J. Neurochem. 2016. 139: 325-37.
2. Liu X., Wang Y., Yu X., et al. // Int. J. Mol. Med. 2017. 41(2): 615-23.
3. Michel P. P., Hirsch E. C., Hunot S. // Neuron. 2016. 90(4): 675-91.
4. Park J.-S., Koentjoro B., Sue C. M. // Front. Mol. Neurosci. 2017. 10: 297.
5. Berezhnov A.V., Soutar M.P., Fedotova E.I. et al. // J. Biol. Chem. 2016. 291(16): 8701-8.
6. Behbahan I., McBrien M., Kurdistani S. // BIO-PROTOCOL. 2014. 4(2).
7. Fedotova E.I., Dolgacheva L.P., Abramov A.Y., Berezhnov A.V. // Mol. Neurobiol. 2022. 59(1): 177-90.
8. Крицкая К.А., Ларюшкин Д.П., Федотова Е.И. и др. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Бережнов А.В., Зинченко В.П. (Ред.). Пятый формат, Серпухов, 2021. 1:333-6.
9. Bartolomé F., Abramov A.Y. // Methods Mol. Biol. 2015. 1264: 263-70.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. 25(4): 402-8.
11. Deas E., Wood N.W., Plun-Favreau H. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. 1813(4): 623-33.
12. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. // J. Parkinsons Dis. 2013. 3(4): 461-91.

# ДЕЙСТВИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ СЕВЕРНОЙ НАВАГИ

Филатова Т.С.<sup>1</sup>, Гуськова В.О.<sup>1</sup>, Абрамочкин Д.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИЦ Кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава РФ, Москва, Россия

**Введение.** Добыча и транспортировка нефти – быстро развивающаяся отрасль промышленности РФ. На данный момент установлено, что порядка 60% всех разведанных запасов углеводородов России сосредоточены именно в Арктическом регионе. Однако, быстрое развитие промышленности порождает ряд потенциальных рисков для морских экосистем Арктики. Два основных вида деятельности человека в Арктике – добыча полезных ископаемых и перевозка различных грузов, таких как сырая нефть и топливо, по Северному морскому пути. Наибольшую опасность для арктических экосистем представляют утечки нефтепродуктов, содержащих экотоксиканты. Наиболее токсичными компонентами нефти являются 2-4 циклические полиароматические углеводороды (ПАУ), содержащиеся в петрогенных и пирогенных источниках. Петрогенные источники, такие как сырая нефть, мазут и дизельное топливо, содержат в основном би- и трициклические ПАУ, обладающие существенной растворимостью в морской воде и накапливающиеся в тканях живых организмов.

Негативное воздействие ПАУ на организм рыбы более всего обусловлено их влиянием на работу сердечнососудистой системы [1]. В частности, негативное влияние фенантрена на электрическую и/или сократительную активность сердца было продемонстрировано у различных видов форели [2], *Danio rerio* [3] и корифены [4]. Однако, проведенные ранее исследования были выполнены на тропических рыбах и представителях лососёвых, а комплексного изучения воздействия отдельных ПАУ на функционирование сердца арктической рыбы до сих пор не проводилось. Кроме того, неизвестен совокупный эффект ПАУ, содержащихся в отечественных сортах нефти, на сердце рыб. Не исследованным остается влияние на функцию сердца отдельных ПАУ, отличных от фенантрена. В связи с этим, целью данного исследования стало изучение негативного эффекта водорастворимой фракции (ВРФ) нефти и трициклического ПАУ флуорена на электрическую активность сердца северной наваги (*Eleginus nawaga*), важного промыслового вида рыб Арктики. Флуорен – трициклический ПАУ, в молекуле которого среднее кольцо, в отличие от фенантрена, пятичленное.



**Материалы и методы.** Работу проводили на изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах наваги методом пэтч-кламп. Кардиомиоциты получали методом энзиматического выделения по описанному ранее протоколу [5] путем ретроградной перфузии сердца бескальциевым раствором с добавлением коллагеназы IA (Sigma) и трипсина (Sigma) в концентрациях 0.37 и 0.12 мг/мл, соответственно, и 0.37 мг/мл БСА. В работе проводили регистрацию потенциалов действия (ПД), быстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ , быстрого натриевого тока  $I_{Na}$ , кальциевого тока  $I_{CaL}$  и калиевого тока входящего выпрямления  $I_{K1}$ .

Регистрацию ПД в желудочковых кардиомиоцитах проводили в отсутствие блокаторов ионных каналов. После получения конфигурации whole-cell усилитель переключали в режим фиксации тока (current clamp) и регистрировали мембранный потенциал. Оценивали влияние ВРФ и флуорена на длительность ПД на уровне 50 (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации, амплитуду ПД, уровень потенциала покоя и максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД.

Для регистрации  $I_{Kr}$  ток индуцировали двухступенчатой деполяризацией от поддерживаемого потенциала -80 мВ. Величину  $I_{Kr}$  оценивали по пику хвостового тока во время реполяризации до -40 мВ. Регистрацию  $I_{Kr}$  проводили в присутствии блокатора кальциевых каналов нифедипина (20 мкМ), а в конце каждого эксперимента подавали селективный блокатор тока  $I_{Kr}$  E-4031 (5 мкМ).

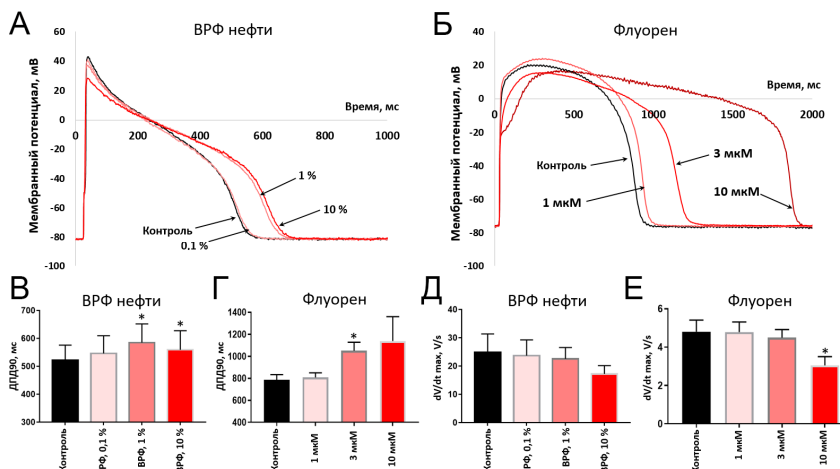
Для регистрации быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  использовали растворы на основе CsCl со сниженной концентрацией  $Na^+$  во внеклеточном растворе. Ток индуцировали ступенчатой деполяризацией с шагом 10 мВ (до +40 мВ) от сильно негативного поддерживаемого потенциала -120 мВ. Эксперименты проводили в присутствии нифедипина (20 мкМ).

Для регистрации тока  $I_{K1}$  использовали линейный (ramp) протокол изменения потенциала: моментальный сдвиг потенциала от поддерживаемого (-80 мВ) до +60 мВ, затем - линейный сдвиг потенциала до -120 мВ, затем - возврат на -80 мВ. Регистрацию проводили в присутствии блокатора  $I_{Kr}$  E-4031 (5 мкМ),  $I_{CaL}$  нифедипина (20 мкМ) и  $I_{Na}$  тетродотоксина (300 нМ).

Для регистрации  $I_{CaL}$  использовали растворы, в составе которых вместо KCl использовали CsCl. Дополнительно в пипеточный раствор добавляли блокатор калиевых токов задержанного выпрямления тетраэтиламмоний. Ток активировали ступенчатой деполяризацией от поддерживаемого потенциала -40 мВ, что позволяло полностью инактивировать натриевые каналы.

ВРФ нефти получали путем перемешивания 1 г образца Западно-сибирской нефти с 1 л раствора Тироде с помощью блендера в течение 30 с с дальнейшим отделением ВРФ от эмульсии нерастворимой компоненты в разделительной воронке в течение 2 часов.

**Результаты.** ВРФ в концентрации 0.1% не вызывает значимых изменений каких-либо измеряемых параметров электрической активности (рис. 1А). ВРФ в концентрациях 1% и 10% вызывает замедление реполяризации, приводящее к увеличению длительности ПД на уровне 90% реполяризации (рис. 1А,В). Видимых изменений значения потенциала покоя не наблюдалось даже при воздействии 10% ВРФ. Скорость нарастания переднего фронта ПД имела тенденцию к снижению при действии 10% ВРФ, однако статистически значимого замедления деполаризации получено не было (рис. 1Д).

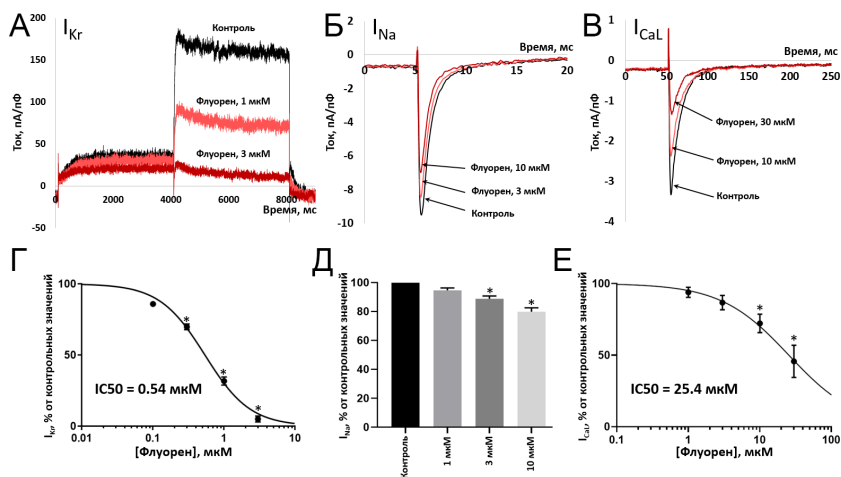


**Рис. 1.** Изменение длительности потенциала действия в желудочковых миоцитах наваги при действии ВРФ в концентрациях 0.1%, 1% и 10%, а также флуорена в концентрациях 1 мкМ, 3 мкМ и 10 мкМ. (А, Б) Оригинальные записи потенциала действия в репрезентативном желудочковом кардиомиоците наваги в контроле и при воздействии ВРФ (А) или флуорена (Б) в указанных концентрациях; (В, Г) Изменение длительности потенциала действия на уровне 90% реполяризации под действием ВРФ (В) или флуорена (Г). (Д, Е) Максимальная скорость нарастания переднего фронта потенциала действия при действии ВРФ (Д) или флуорена (Е). \*- статистически значимые отличия от контрольных значений для различных концентраций ВРФ и флуорена ( $p < 0.05$ ; однофакторный дисперсионный анализ,  $n = 7-9$  клеток от 3 рыб).

Таким образом, основным эффектом ВРФ нефти является замедление реполяризации. Флуорен в концентрациях 3 и 10 мкМ также вызывал замедление реполяризации (рис. 1Б, Г), приводящее к увеличению длительности ПД на уровне 90% реполяризации (рис. 1Г).

Также флуорен в концентрации 10 мкМ снижает скорость нарастания переднего фронта ПД, вызывая значимое замедление деполяризации (рис. 1Е).

ВРФ нефти в 3 протестированных концентрациях вызвала достоверное снижение величины быстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ . Эффект наблюдался при всех позитивных значениях мембранного потенциала. Степень чувствительности  $I_{Kr}$  к действию ВРФ была практически одинаковой в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах. Расчетная  $IC_{50}$  составила 3.5% ВРФ для предсердных и 3.2% для желудочковых миоцитов. Таким образом, ВРФ нефти оказывает мощное блокирующее воздействие на каналы ERG в кардиомиоцитах наваги. Флуорен, как и ВРФ нефти, вызывал выраженное подавление  $I_{Kr}$  (рис. 2А). В результате тестирования всего диапазона концентраций была определена  $IC_{50}$  для подавления  $I_{Kr}$  флуореном, составившая 0.54 мкМ (рис. 2Г).



**Рис. 2.** Ингибирование флуореном быстрого калиевого тока задержанного выпрямления  $I_{Kr}$ , быстрого натриевого тока  $I_{Na}$  и кальциевого тока  $I_{CaL}$ . (А-В) Оригинальные записи  $I_{Kr}$  (А),  $I_{Na}$  (Б),  $I_{CaL}$  (В) в репрезентативном желудочковом кардиомиоците наваги в контроле и при действии флуорена в указанных концентрациях; (Г, Е) Кривые "Концентрация-эффект", демонстрирующие действие флуорена на  $I_{Kr}$ , индуцированный деполяризацией до +40 мВ (Г) и  $I_{CaL}$ , индуцированный деполяризацией до 0 мВ (Е). \* – статистическая значимость эффекта флуорена ( $p < 0.05$ , однофакторный анализ RM-ANOVA с использованием post-hoc теста Даннетта для соответствующих абсолютных значений); (Д) Изменение амплитуды тока  $I_{Na}$  (-20 мВ) при действии различных концентраций флуорена; \* – статистическая значимость эффекта ( $p < 0.05$ , однофакторный анализ RM-ANOVA с использованием post-hoc теста Даннетта для соответствующих абсолютных значений).

Ни одна из протестированных концентраций ВРФ нефти, в том числе 10%, не вызывала видимого снижения  $I_{Na}$  ни в предсердных, ни в желудочковых кардиомиоцитах. Флуорен в концентрации 1 мкМ не оказывал значимого влияния на  $I_{Na}$ , однако концентрации 3 и 10 мкМ вызывали статистически значимое подавление  $I_{Na}$  (рис. 2Б, Д).

Даже в максимальной исследованной концентрации (10%) ВРФ не вызывала никаких видимых изменений величины  $I_{K1}$ , что вполне согласуется с данными, полученными ранее на миоцитах наваги для одного из компонентов ВРФ, фенантрена. Также флуорен во всех исследованных концентрациях не оказывал значимого влияния на ток  $I_{K1}$ . Таким образом, в отличие от  $I_{Kr}$ , ток  $I_{K1}$  оказался совершенно нечувствителен как к ВРФ, так и к флуорену.

ВРФ в концентрации 0.1% не вызывала достоверных изменений параметров  $I_{CaL}$ . В концентрациях 1 и 10% ВРФ достоверно уменьшала величину  $I_{CaL}$ , измеренного при деполяризации до 0 мВ, при этом не вызывала существенных изменений скорости инактивации тока. Расчетная  $IC_{50}$  для амплитуды  $I_{CaL}$  составила 10.6%. Таким образом, в отличие от натриевого тока  $I_{CaL}$  чувствителен к воздействию высоких концентраций ВРФ нефти, при этом его чувствительность намного меньше, чем у тока  $I_{Kr}$ . Флуорен в концентрациях 10 мкМ и 30 мкМ достоверно снижал величину тока  $I_{CaL}$  (рис. 2В). Расчетная  $IC_{50}$  для тока  $I_{CaL}$  составила 25.4 мкМ (рис. 2Е). Таким образом,  $I_{CaL}$  чувствителен к воздействию высоких концентраций флуорена, таких как 10 и 30 мкМ.

Обнаруженное действие ВРФ и флуорена в отношении ионных токов объясняет механизм изменения конфигурации электрической активности. Поскольку основным реполяризирующим током в кардиомиоцитах рыб является  $I_{Kr}$ , и именно он показывает наибольшую чувствительность к ВРФ и флуорену, неудивительно, что как ВРФ, так и флуорен вызывают ярко выраженное удлинение ПД. При этом чувствительность к ПАУ тока  $I_{CaL}$ , противостоящего реполяризирующему действию  $I_{Kr}$ , оказалась сравнительно небольшой, поэтому уменьшение  $I_{CaL}$  ВРФ и флуореном не сказывается на изменении конфигурации ПД. С другой стороны, ток  $I_{K1}$ , поддерживающий негативный потенциал покоя, совершенно нечувствителен к действию ПАУ, поэтому ни ВРФ, ни флуорен не вызывают изменений потенциала покоя. Ток  $I_{Na}$  существенно ингибируется только флуореном, поэтому скорость переднего фронта ПД, а значит и скорость распространения возбуждения по миокарду, также снижается флуореном, но не ВРФ. Показанные изменения электрической активности – замедление скорости деполяризации и выраженное удлинение ПД, способствуют аритмогенезу [6] и позволяют объяснить негативное действие ПАУ на работу сердца рыб.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Incardona J.P., Scholz N.L.* // Fish Physiol. 2017. 36(B): 373-433.
2. *Vehniäinen E.R., Haverinen J., Vornanen M.* // Environ. Toxicol. Chem. 2019. 38(10): 2145-53.
3. *Kompella S.N., Brette F., Hancox J.C., Shiels H.A.* // J. Gen. Physiol. 2021. 153(2): 105823.
4. *Heuer R.M., Galli G.L.J, Shiels H.A. et al.* // Environ. Sci. Technol. 2019. 53(16): 9895-904.
5. *Abramochkin D.V., Vornanen M.* // J. Comp. Physiol. B. 2017. 187: 329-38.
6. *Abramochkin D.V., Filatova T.S., Pustovit K.B. et al.* // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 2022. 268: 111204.

### ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА, ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО АГОНИСТА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

*Фокина Е.А., Деркач К.В., Морина И.В., Бахтюков А.А.,  
Баюнова Л.В., Лебедев И.А., Романова И.В., Шнаков А.О.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Нарушение сперматогенеза у мужчин часто ассоциировано с такими метаболическими расстройствами, как сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром (МС), абдоминальное ожирение [1,2]. Это обусловлено характерными для этих заболеваний усилением воспалительных и аутоиммунных процессов, гиперпродукцией активных форм кислорода, липотоксичностью, накоплением конечных продуктов гликирования, а также нарушением гормональной регуляции и функциональной активности компонентов гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (ГГТ) оси [2,3]. Имеются убедительные доказательства, что пептиды инсулинового семейства (инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1) и адипокины (в первую очередь, лептин) играют важную роль в контроле функций гипоталамических нейронов, экспрессирующих гонадолиберин, и вовлечены в регуляцию процессов тестикулярного стероидогенеза и сперматогенеза [4,5]. Вследствие этого инсулиновая и лептиновая резистентность, являющиеся следствием длительного повышения уровней инсулина и лептина в крови, вносят значимый вклад в ослабление функций ГГТ оси при метаболических расстройствах. Антидиабетический препарат метформин снижает массу тела и жировой ткани, нормализуя уровень лептина в крови, а также повышает

чувствительность тканей к инсулину, ослабляя инсулиновую резистентность, и тем самым может оказывать положительный эффект на ГГТ ось и сперматогенез [6,7]. Наряду с этим, сперматогенная функция может быть нормализована агонистами рецептора лютеинизирующего гормона, которые восстанавливают сниженную при диабетической патологии и МС продукцию тестостерона, важнейшего регулятора созревания сперматозоидов. Целью работы было оценить восстанавливающие эффекты длительной метформиновой терапии (5 недель, суточная доза 120 мг/кг, перорально) и пятидневной обработки с помощью ЛГР-агонистов – хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (суточная доза 20 МЕ/крысу, подкожно) и аллостерического агониста ТП03 (суточная доза 15 мг/кг/сутки, внутривнутрибрюшинно) на сперматогенез у самцов крыс, нарушенный вследствие развития у них МС, вызванного 23-недельной диетой, обогащенной насыщенными жирами.

**Методика.** Для экспериментов использовали половозрелых самцов крыс линии Wistar, часть из которых (Контроль) находилась на стандартной диете (гранулированный сухой корм), в то время как другая часть, начиная с двухмесячного возраста была переведена на диету, обогащенную насыщенными жирами, имеющую следующий состав: 52.4% свиного сала, 41.7% творога, 5% печеночного паштета, 0.5% L-метионина, 0.2% пекарских дрожжей и 0.2% NaCl [8]. Продолжительность диеты составила 23 недели, в это время крысы в дополнение к стандартному сухому корму ежедневно получали по 5-7 г высокожировой смеси. По окончании эксперимента крысы были декапитированы под наркозом (хлоральгидрат, 400 мг/кг), и у них были изъяты ткани семенников для исследования морфологии семенных канальцев и оценки спермограммы. Все процедуры по работе с животными осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Развитие МС на 18-й неделе диеты оценивали с помощью интраперитонеального глюкозотолерантного теста, отбирая крыс с повышенным содержанием глюкозы в крови через 120 мин после нагрузки (выше 7.2 мМ), что свидетельствует о нарушенной толерантности к глюкозе. При отборе животных также принимали во внимание повышение массы тела, не менее чем на 10% в сравнении с контролем. На основании полученных данных формировали группы без лечения (МС) и с лечением метформинном (МСМ), и за неделю до окончания эксперимента (за 2 дня до обработки части животных с помощью ЛГР-агониста) проводили повторный тест с глюкозной нагрузкой, оценивая интегрированные в течение 120 мин уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови. Для этого использовали тест-полоски «One-Touch Select Ultra» (США), ИФА-наборы «Rat Insulin ELISA» (Mercodia AB, Швеция) и «ELISA Kit for Leptin»

(Cloud-Clone Corp., США). В общей сложности исследовали пять групп (в каждой по 6 животных): Контроль, МС (без обработки), МСМ (метформин), МСТ (ТП03), МСГ (ХГЧ). В конце эксперимента, через 5 ч после последней обработки, с помощью набора «Тестостерон-ИФА» (Алкор-Био, Россия) оценивали концентрацию тестостерона в крови.

Для исследования спермы у самцов крыс из каудальной части эпидидимуса извлекали 5 мг сперматозоидов (СП), помещали их в 195 мкл среды «Quinn's Advantage™ Medium With HEPES» (In Vitro Fertilization Inc., Cooper Surgical Company, США), инкубировали (30 мин, 37°C). В счетную камеру Маклера добавляли 10 мкл разбавленной семенной жидкости, подсчитывали количество клеток с помощью микроскопа «MICMED-5» (×400, ЛОМО, Россия), результаты представляли, как число клеток на 1 г эпидидимуса. Количество подвижных СП и СП с поступательным движением рассчитывали, как процент от общего их числа, принятого за 100%. Морфологию изучали после окрашивания мазка азуром и эозином с использованием набора реагентов «Спермо-Дифф-200» (Синтакон, Россия), рассчитывая количество дефектных СП с извитым хвостом или дефектами головки на каждые 100 СП. Для визуализации использовали микроскоп «Axio Lab.A1 MAT» (Carl Zeiss, Германия) со встроенной камерой (×1000), используя программу Axio-Vision 4.8.

Для морфологического анализа семенников их фиксировали в течение 48 ч (+4°C) в 4%-ном *para*-формальдегиде (Sigma, США), промывали 0.9% Na-фосфатным буфером (PBS), погружали в PBS, содержащий 30% сахарозу (+4°C), замораживали на сухом льду в среде «Tissue-Tek®» (Sacura Finetek Europe, Нидерланды). Серии поперечных срезов из различных уровней яичка (6 мкм) готовили с помощью криостата «Leica CM-1520» (Leica Microsystems, Германия) и монтировали на стеклах «SuperFrost/plus» (Menzel, Германия). Срезы из разных групп помещали на одно стекло, сушили в течение ночи и использовали для гистохимического анализа, который проводили, как описано в работе [9]. Образцы анализировали с помощью микроскопа «Carl Zeiss Imager A1» (Германия). С помощью объектива ×40 на одной и той же площади срезов, соответствующих различным уровням яичка, подсчитывали количество сперматогониев и пахитеновых сперматоцитов. С помощью объектива ×20 и программного обеспечения «Carl Zeiss» (Axio Vision 4.7.2, Германия) делали микрофотографии и оценивали толщину семенного эпителия (мкм).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ «SPSS Statistics 22» (IBM, США). Множественные сравнения проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и многомерного анализа общей линейной модели с апостериорным тестом Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0.05$ , результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ .

**Результаты и их обсуждение.** Крысы с МС имели повышенную массу тела и жировой ткани, постпрандиальную гипергликемию, нарушенную толерантность к глюкозе, гиперинсулинемию и гиперлептинемию, а также сниженный на 35% в сравнении с контролем уровень тестостерона в крови. Пятинедельная терапия метформинем в значительной степени нормализовала эти показатели, в том числе восстановила до контрольного уровня концентрацию тестостерона. Обработка крыс ТПО3 и ХГЧ существенно повысила уровень тестостерона – соответственно на 243 и 346% в сравнении с контрольной группой и на 430 и 589% в сравнении с группой МС.

Анализ спермограмм позволил получить следующие результаты. В группе МС отмечали снижение общего числа СП и числа их подвижных форм, в том числе с поступательным движением (в пересчете удельной доли подвижных СП в общем пуле клеток на абсолютное количество подвижных СП). Отмечалось также повышение количества дефектных СП (табл. 1). Морфологический анализ семенных канальцев показал значимое уменьшение толщины эпителия семенных канальцев и числа сперматогониев и пахитеновых сперматоцитов (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о значительных нарушениях процесса сперматогенеза у крыс с МС и изменению у них ультраструктурной организации сперматогенного эпителия, что соответствует данным литературы [3].

**Табл. 1.** Показатели спермограммы у самцов крыс с диета-индуцированным МС, которые получали пятинедельное лечение метформинем или в течение 5 дней были обработаны ЛГР-агонистами – ХГЧ и ТПО3.

Группа	Количество СП, $\times 10^6/\text{мл}$	Доля СП с морфологическими дефектами, %	Доля подвижных СП, %	Доля СП с поступательным движением, %
Контроль	22.80 $\pm$ 3.28	5.82 $\pm$ 0.98	44.53 $\pm$ 7.30	29.74 $\pm$ 6.69
МС	10.67 $\pm$ 2.10*	22.83 $\pm$ 3.01*	31.79 $\pm$ 4.62	18.60 $\pm$ 4.31
МСМ	15.68 $\pm$ 1.98	13.67 $\pm$ 3.12	36.50 $\pm$ 5.05	26.25 $\pm$ 5.44
МСТ	17.33 $\pm$ 1.04#	18.53 $\pm$ 4.59*	44.90 $\pm$ 6.13	29.03 $\pm$ 4.60
МСГ	19.83 $\pm$ 2.95	19.67 $\pm$ 2.87*	52.37 $\pm$ 4.53	22.91 $\pm$ 3.84

**Примечание:** \* – различия по сравнению с группой К статистически значимы при  $p < 0.05$ ; # – различия по сравнению с группой МС статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

Пятинедельное лечение метформинем приводило к частичному восстановлению общего числа эпидидимальных СП и их подвижности, снижало число дефектных их форм, а также значимо повышало толщину сперматогенного эпителия и количество пахитеновых сперматоцитов в сравнении с группой МС (табл. 1). Следует, однако, отметить, что толщина эпителия семенных канальцев и число сперматогониев в них оставались



ниже их значений в контрольной группе (табл. 2). Это свидетельствует о том, что метформин обладает выраженным восстановительным эффектом в отношении нарушенной при МС сперматогенной функции, и это указывает на перспективы применения метформиновой терапии не только для восстановления метаболического и гормонального статуса при диабете и МС, но и для нормализации функций мужской репродуктивной системы. Тем самым, наши данные поддерживают точку зрения о том, что метформин может рассматриваться как важный фармакологический препарат для улучшения фертильности при метаболических расстройствах, включая МС, причем это относится не только к мужской, но и к женской репродуктивной системе [6,7].

**Табл. 2.** Влияние пятидневного лечения метформинном и пятидневной обработки агонистами ЛГР (ТП03, ХГЧ) на толщину эпителия семенных канальцев и количество сперматогоний и пахитеновых сперматоцитов в них у крыс с МС.

Группа	Толщина сперматогенного эпителия, мкм	Число сперматогониев, ед.	Число пахитеновых сперматоцитов, ед.
Контроль	68.50±0.67	64.24±1.26	55.02±0.95
МС	61.20±1.05*	53.16±1.21*	48.31±0.71*
МСМ	65.58±0.98*#	57.55±1.19*	53.19±0.87#
МСТ	68.01±1.32#	62.80±1.41#	54.76±1.13#
МСГ	64.28±2.47	60.02±1.02*#	53.08±0.99#

**Примечание:** \* – различия по сравнению с группой К статистически значимы при  $p < 0.05$ ; # – различия по сравнению с группой МС статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее ± SEM ( $n = 6$ ).

Агонисты ЛГР приводили к частичному восстановлению общего числа СП и доли их подвижных форм (в пересчете удельной доли подвижных СП в общем пуле клеток на абсолютное количество подвижных СП), а также нормализовали толщину эпителия семенных канальцев и процесс созревания сперматозоидов в них (табл. 1, 2). При этом ТП03, в сравнении с ХГЧ, в меньшей степени влиял на общее число СП и количество их подвижных форм, но восстанавливал до контрольного уровня число СП с поступательным прямолинейным движением и толщину сперматогенного эпителия (табл. 1, 2). Необходимо отметить, что, в отличие от метформина, ЛГР-агонисты сравнительно слабо влияли на долю дефектных форм СП, которая оставалась значимо выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

Тем самым, различающиеся по механизмам действия ЛГР-агонисты, воздействующие на внеклеточный ортостерический (ХГЧ) или трансмембранный аллостерический (ТП03) сайты рецептора, оба в значительной степени нормализуют сперматогенез у МС-крыс, что обусловлено их стероидогенным эффектом и способностью влиять на

пролиферативную активность и процессы дифференцировки тестикулярных клеток. Однако необходимо принимать во внимание тот факт, что при длительной обработке ЛГР-агонистами в ГГТ оси могут запускаться отрицательные обратные связи, которые способны воспрепятствовать нормальному сперматогенезу, как это имеет место при длительной терапии гонадотропинами. В этом отношении ТПО3, действующий более мягко, имеет определенные преимущества.

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-75-20122).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Cohen D.J., Giaccagli M.M., Herzfeld J.D. et al.* // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2021. 22: 1057-71.
2. *Lotti F., Marchiani S., Corona G., Maggi M.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22: 1988.
3. *Zaiko A., Siewko K., Krętowski A.J., Milewski R.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022. 20: 732.
4. *Oghbaei H., Fattahi A., Hamidian G. et al.* // Gen. Comp. Endocrinol. 2021. 300: 113643.
5. *Ghaderpour S., Ghiasi R., Heydari H., Keyhanmanesh R.* // Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 2021. 43: 235-47.
6. *Shpakov A.O.* // Pharmaceuticals (Basel). 2021. 14: e42.
7. *Tseng C.H.* // World J. Mens Health. 2022. 40: 11-29.
8. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V. et al.* // Int. J. Endocrinol. 2015. 2015: 245459.
9. *Shokoohi M., Shoorei H., Soltani M. et al.* // Andrologia. 2018. 50:e13047.

## АНАЛИЗ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ УКАЗЫВАЕТ НА КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ ПЕРИЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ВАЗОКОНСТРИКЦИИ

*Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.*

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**Введение.** Регуляция тонуса артерий является одним из ключевых факторов регуляции артериального давления. Тонус сосудов определяется динамическим равновесием между констрикцией и дилатацией. На сосуды одновременно действуют как вазоконстрикторы, так и вазодилататоры, а смещение равновесия ответа сосуда на действующие вещества приводит к изменению диаметра просвета сосудов. В ответ на изменение просвета сосудов меняется локальная перфузия тканей и/или системное

артериальное давление. Одним из наиболее клинически и социально значимых заболеваний, сопряженных с нарушением равновесия вазоконстрикции и вазодилатации является артериальная гипертензия, ассоциированная с ожирением. Ожирение приводит к развитию артериальной гипертензии за счет гиперактивации симпатической нервной системы и ренин-ангиотензиновой системы, что опосредует усиление вазоконстрикции. Также, при ожирении нарушаются процессы вазодилатации вследствие повреждения эндотелия сосудов [1].

Стенки сосудов в основном состоят из эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток (ГМК) и перицитов. Последние два типа клеток часто объединяют в группу муральных клеток. Эндотелиальные клетки выстилают просвет сосудов и в основном принимают участие в регуляции вазодилатации. Воздействие на эндотелиальные клетки вазодилататоров, например, брадикинина, ацетилхолина или субстанции P, приводит к выработке монооксида азота и простациклина. Эти вещества в свою очередь действуют на ГМК, запуская их расслабление [2]. Вазоконстрикция, напротив, не зависит от эндотелиальных клеток, и классически считается, что она реализуется путем прямого действия гормонов и нейромедиаторов, таких как ангиотензин II и норадреналин, на ГМК [3]. Перициты в основном участвуют в регуляции регионарного кровотока. Так, перициты в зависимости от степени активности, изменяют, уровень кровотока в различных участках головного мозга [4]. Роль перицитов в регуляции системного артериального давления изучена слабо. Однако в последнее время накапливается все больше данных, указывающих на ключевую роль перицитов в регуляции артериального давления и участии этих клеток в развитии артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Ранее в нашей лаборатории была определена локализация  $\alpha 1$ -адренорецепторов, запускающих вазоконстрикцию при действии катехоламинов, в сосудистых клетках. Было обнаружено, что  $\alpha 1$ -адренорецепторы у пациентов с ожирением и нормальным давлением в основном локализируются на перицитах, а не на гладкомышечных клетках. У пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии, перициты, вероятно, меняют свой фенотип на ГМК-подобный. В результате  $\alpha 1$ -адренорецепторы у пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, обнаруживаются не только в перицитах, но и в клетках, экспрессирующих  $\alpha$ -гладкомышечный актин [5]. Эти данные ставят под сомнение классическое мнение о прямом действии норадреналина на ГМК. Также можно предположить, что другие вазоконстрикторы действуют на перициты, а не напрямую на ГМК. Закономерно возникает гипотеза о том, что сигнальные стимулы, регулирующие контракцию сосудов, действуют на регуляторные клетки – перициты – которые, в свою очередь, паракринно управляют ответом ГМК, синхронизируя и координируя его.

Основными вазоконстрикторами и вазодилаторами являются гормоны и нейромедиаторы, действующие через рецепторы, связанные с G-белками [6]. Для вазоконстрикторов ангиотензина, вазопрессина, эндотелина и норадреналина это ангиотензиновые рецепторы 1 типа (*AGTRI*), аргинин-вазопрессиновые рецепторы 1 типа (*AVPR1A*), эндотелиновые рецепторы А и В типов (*EDNRA*, *EDNRB*) и  $\alpha$ 1-адренорецепторы, соответственно. А для вазодилаторов ацетилхолина и брадикинина это М3-холинорецепторы и рецепторы брадикинина 1 типа, соответственно. Рецепторы вазоконстрикторов запускают кальциевую сигнализацию в клетках, что опосредует взаимодействие миозина с актином и запускает мышечное сокращение. Вазодилатация опосредована цАМФ- и цГМФ-зависимыми сигнальными каскадами и направлена на ингибирование действия кальция, что в результате приводит к расслаблению ГМК [7]. В данной работе мы проанализировали распределение рецепторов основных вазодилаторов и вазоконстрикторов в сосудах жировой ткани человека.

**Материалы и методы.** Данные секвенирования одиночных клеток стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани человека были взяты из базы данных GEO (GSE155960, GSE128889) и GSA (HRA000901) [8–10]. Данные проанализированы с помощью CellRanger 7.0.0. Удаление вероятных дублетов клеток осуществлено с помощью метода scDblFinder с использованием DoubletCollection 1.1.0 [11]. Далее проведен качественный контроль образцов, нормализация данных, уменьшение размерности, интеграция, кластеризация и определение дифференциально экспрессированных генов с помощью Seurat 4.1.0 и Harmony 0.1.1 [12,13]. Анализ клеточных типов выполнен с помощью g:Profiler, PanglaoDb и scType [14,15]. Из данных удалены все клетки, не входящие в стенку резистивных артериол и мелких артерий, оставлены только перициты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки артерий и артериол.

Список генов рецепторов, ассоциированных с G-белками, был взят из баз данных HGNC и GtoPdb.

**Результаты.** Для того чтобы проанализировать локализацию рецепторов вазоконстрикторов и вазодилаторов в жировой ткани человека, мы воспользовались методами РНК секвенирования одиночных клеток (single-cell RNAseq). Мы взяли образцы секвенирования с открытых баз GEO и GSA из трех статей, сделанных разными научными группами. Мы провели интеграцию 17 образцов, то есть объединили клетки разных образцов по экспрессии тысяч различных генов. Далее мы определили клеточные типы и кластеризовали клетки с помощью алгоритмов Seurat, scType и g:Profiler. Мы обнаружили, макрофаги (специфичные маркеры *CD14*, *CSF1R*, *CD163*), дендритные (*CD209*, *ITGAX*) и тучные клетки (*ENPP3*, *KIT*, *CPA3*), Т- (*CD3E*, *CD3D*, *CD3G*) и

В-клетки (*CD79A*, *CD79B*, *MS4A1*), эндотелиальные клетки кровеносных (*PECAM1*, *FLT4*, *CDH5*) и лимфатических сосудов (*CCL21*, *FLT4*), а также стволовые клетки жировой ткани (*DPP4*, *SCARA5*, *CD55*), преадипоциты (*CXCL14*, *BMPER*, *PPARG*), ГМК (*MYH11*, *ACTG2*, *CNN1*) и перициты (*MYO1B*, *PDGFRB*, *STEAP4*). Перициты дополнительно характеризовались отсутствием экспрессии генов-маркеров ГМК. В дальнейшем мы удалили из анализа все иммунные клетки, эндотелиальные клетки лимфатических сосудов, преадипоциты и стволовые клетки жировой ткани. В получившемся датасете мы оставили эндотелиальные и муральные клетки. Среди эндотелиальных клеток кровеносных сосудов мы обнаружили эндотелиальные клетки артерий (*GJA4*, *GJA5*, *JAG1*), вен (*ACKR1*, *SELP*, *SELE*) и капилляров (*RGCC*, *CA4*, *SPARC*) [16]. Так как в регуляции артериального давления вносит вклад только тонус артерии, то мы удалили эндотелиальные клетки капилляров и вен.

В получившемся датасете мы проанализировали распределение рецепторов, связанных с G-белками, задействованных в регуляции тонуса сосудов. Мы выяснили, что рецепторы основных вазоконстрикторов, таких как ангиотензин II (*AGTRI*), вазопрессин (*AVPR1A*) и эндотелин (*EDNRB*) экспрессируются в перицитах, а не в гладкомышечных клетках. Рецептор эндотелина А типа (*EDNRA*) экспрессируется равномерно в ГМК и перицитах. Только рецептор нейропептида Y 1 типа (*NPY1R*) значимо выше экспрессируется в ГМК относительно перицитов.

Помимо этого, часть вазодилаторов тоже, вероятно, действует через перициты. Так, мы обнаружили, что рецепторы вазодилаторов, таких как паратиреоидный гормон (*PTH1R*), простагландин Е (*PTGER3*), вазоактивный интестинальный пептид (*VIPR1*) и глюкозозависимый инсулилотропный полипептид (*GIPR*) также экспрессируются в перицитах, а не в ГМК или эндотелиальных клетках [17–20]. На эндотелиальных клетках артерий значимо сильнее экспрессируется только M3-холинорецепторы, которые опосредуют вазодилатацию [21].

Полученные результаты указывают на центральную роль перицитов в регуляции тонуса сосудов и уровня артериального давления. Вероятно, перициты являются клетками, воспринимающими гормональные сигналы и регулирующими функции ГМК в сосудах. Можно предположить, что передача сигналов от перицитов к ГМК осуществляется за счет щелевых контактов между клетками [22]. Результаты биоинформатического анализа, полученные нами, требуют дальнейшей проверки другими методами.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке РФФ в рамках проекта № 21-15-00311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Theodore A. Kotchen*. // *Am. J. Hypertens.* 2010. 23(11): 1170-8.
2. *Quyuyumi A.A., Ozkor M.A.* // *Cardiol. Res. Pract.* 2011. 1(1): 1-12.
3. *Brozovich F.V. et al.* // *Pharmacol. Rev.* 2016. 68(2): 476-32.
4. *Hartmann D.A. et al.* // *Nat. Neurosci.* 2021. 24(5): 633-45.
5. *Chechekhin V. et al.* // *Cells.* 2023. 12(585): 1-14.
6. *Chechekhin V. et al.* // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. 10: 1-11.
7. *Brincks H.L., Eckhart A.D.* // *Biochim. Biophys. Acta J.* 2010. 1802(1): 1268-75.
8. *Hildreth A.D. et al.* // *Nat. Immunol.* 2021 22(5): 639-53.
9. *Liu X. et al.* // *Cell Discov.* 2022. 8(1): 1-20.
10. *Merrick D. et al.* // *Science.* 2019. 364: 1-25.
11. *Xi N.M., Li J.J.* // *Cell Syst.* 2021. 12(2): 176-94.
12. *Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E.* // *Cell.* 2021 184: 3573-87.
13. *Korsunsky I. et al.* // *Nat. Methods.* 2019. 16(12): 1289-96.
14. *Raudvere U., Kolberg L., Kuzmin I.* // *Nucleic Acids Res.* 2019. 47: 191-8.
15. *Ianevski A., Giri A.K., Aittokallio T.* // *Nat. Commun.* 2022. 13(1): 1-10.
16. *He Y. et al.* // *Cells.* 2022. 11(7): 1-17.
17. *Benson T. et al.* // *Osteoporos. Int.* 2016. 27(5): 1817-26.
18. *Grant S. et al.* // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006. 26(1): 58-67.
19. *Amar M. et al.* // *Diabetes.* 2017. 66(9): 2363-71.
20. *Yang T., Du Y.* // *Am. J. Hypertens.* 2012. 25(10): 1042-9.
21. *Seigo F., Tomohiro M.* // *Eur. J. Pharmacol.* 1991. 202(1): 9-15.
22. *Ivanova E., Kovacs-Oller T., Sagdullaev B.T.* // *J. Neurosci.* 2017. 37(32): 7580-94.

### МОДУЛЯЦИЯ ТОЛФЕНАМОВОЙ КИСЛОТОЙ ГАМК- АКТИВИРУЕМЫХ ТОКОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА

*Шаронова И.Н.<sup>1</sup>, Дворжак А.Ю.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФБГНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

<sup>2</sup>Отдел экспериментальной неврологии, Шарите, Берлин, Германия

**Введение.** Толфенамовая кислота (ТФК) (торговое наименование «Клотам») является нестероидным противовоспалительным средством (НПВС) из группы фенаматов. В клинической практике эти препараты используются как противовоспалительные, жаропонижающие и анальгезирующие средства. Полагают, что большинство эффектов ТФК, так же как и других НПВС связано со способностью этих препаратов угнетать синтез простагландинов путем ингибирования циклооксигеназного пути [1]. Однако относительно недавно были выявлены новые свойства НПВС, расширяющие их возможное применение а клинической практике. Так, было обнаружено, что некоторые НПВС обладают противоопухолевой активностью, не связанной с их влиянием на активность циклооксигеназ [2]. Выявлены

также антиоксидантные свойства ТФК [3]. Кроме того, фенаматы, включая ТФК, рассматриваются как потенциальные терапевтические средства для лечения нейродегенеративных заболеваний [4]. В частности, показано, что введение ТФК способно замедлять развитие болезни Альцгеймера (БА) [5]. Обнаружено, что под действием ТФК снижается уровень предшественника бета-амилоида (APP протеина) и Аβ (1-42) в коре мозга, а также устраняется когнитивный дефицит у мышей с трансгенной моделью БА [6]. Недавно были получены данные, позволяющие предполагать, что ТФК обладает потенциалом в качестве терапевтического средства для лечения тауопатий, включая БА [7-8].

Хорошо известно также, что фенаматы способны непосредственно взаимодействовать с различными ионными каналами, включая ГАМК<sub>A</sub> рецепторы в нейронах головного мозга [9]. В этом плане наиболее изучены эффекты нифлумовой и мефенамовой кислот [10,11], но практически отсутствуют данные о модуляции функции ГАМК<sub>A</sub> рецепторов толфенамовой кислотой. Вместе с тем, учитывая приведенные выше данные о возможном использовании ТФК в качестве противоопухолевого препарата и средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, представляется важным изучить весь спектр эффектов этого препарата, и, в частности, его влияние на работу ГАМК<sub>A</sub> рецепторов центральных нейронов. Цель настоящей работы состояла в изучении взаимодействия ТФК с ГАМК<sub>A</sub> рецепторами в нейронах головного мозга.

**Методы.** Опыты проводили на клетках Пуркинье, механически изолированных из срезов мозжечка 14-18-дневных крыс с помощью метода вибродиссоциации [12]. Срезы мозга инкубировали при комнатной температуре в физиологическом растворе следующего состава (в мМ): 124 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.6 MgCl<sub>2</sub>, 1.28 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, глюкоза – 14. Раствор насыщали карбогеном (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Выделение клеток и регистрацию их активности производили в растворе следующего состава (в мМ): 145 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.8 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Микропипетки, изготовленные из боросиликатного стекла, заполняли раствором следующего состава (в мМ): 100 CsCl, 30 CsF, 3 MgCl<sub>2</sub>, 2 Na<sub>2</sub>ATФ, 5 ЭГТА, 10 HEPES-Na. Использовали микропипетки, имеющие сопротивление 2-3 МОм. Эксперименты проводили при комнатной температуре (22-24°C). Токи, активируемые ГАМК, регистрировали с помощью пэтч-кламп метода в конфигурации «целая клетка».

Концентрационная зависимость для токов, активируемых ГАМК, описывалась логистическим уравнением:

$$A = 1 / (1 + (EC_{50} / [ГАМК])^h), \quad (1),$$

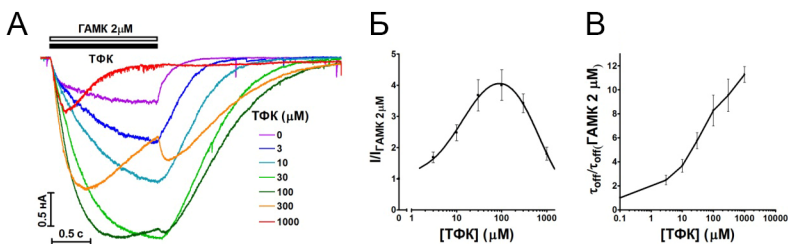
где  $A = I_A / I_{A(300 \text{ мкМ})}$  – относительный ответ, вызываемый ГАМК;  $EC_{50}$  – концентрация ГАМК, вызывавшая полумаксимальный ответ;  $h$  – коэффициент Хилла.

Поскольку концентрационная зависимость эффекта ТФК имела колоколообразный характер, для количественной оценки влияния ТФК на токи, активируемые постоянной концентрацией ГАМК, использовали модифицированное уравнение Хилла:

$$B([ТФК]) = B(1/(1+(EC_{50}/[ТФК])^{h_1}) - 1/B(1/(1+([ТФК]/IC_{50})^{h_2}))) \quad (2),$$

где [ТФК] – концентрация ТФК,  $EC/IC$  – концентрации ТФК, которые вызывают 50% потенциации/блока по отношению к максимальному ответу,  $h_1/h_2$  – коэффициенты Хилла для потенциации/блока,  $B$  – максимально возможная величина потенциации. Ответы нормировались к амплитуде тока, вызывавшегося в отсутствие ТФК. Количественные данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартные ошибки среднего.

**Результаты и обсуждение.** Во всех исследовавшихся нейронах (в работе представлены данные, полученные при регистрации активности 23 нейронов) аппликация ГАМК в концентрации от 1 до 300 мкМ при поддерживаемом потенциале  $-70$  мВ вызвала входящий ток, амплитуда которого возрастала при увеличении концентрации агониста. Полумаксимальная эффективная концентрация для активации ГАМК<sub>A</sub> рецепторов составляла  $5.3 \pm 0.4$  мкМ ( $n = 9$ ). Концентрационную зависимость эффектов ТФК исследовали при ко-аппликации 2 мкМ ГАМК с различными концентрациями ТФК (рис. 1). Результаты анализа с использованием уравнения Хилла (2), усредненные для 10 нейронов, имели следующие значения:  $EC_{50} = 10.1 \pm 3.2$  мкМ,  $h_1 = 1.23 \pm 0.14$ , максимальный процент потенциации (по результатам подгонки)  $A(\infty) = 421 \pm 93\%$ , ( $n = 10$ ). При концентрациях ТФК выше 100 мкМ величина потенциации уменьшалась и сменялась блоком (рис. 1А, Б).

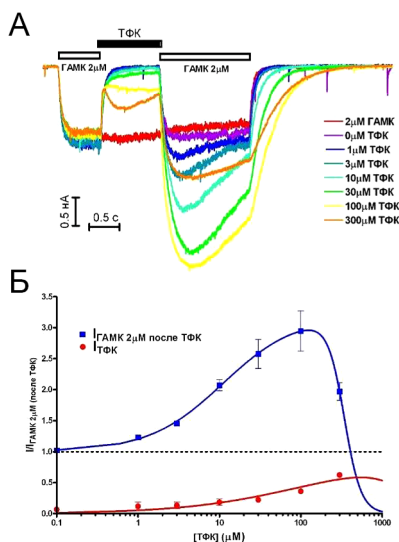


**Рис. 1.** Модуляция ГАМК-токов, толфенамовой кислотой (ТФК). (А) Записи токов на ко-аппликацию 2 мкМ ГАМК с различными концентрациями ТФК (3-1000 мкМ) и контрольная запись (ГАМК 2 мкМ), наложенные друг на друга. (Б) Зависимость относительной амплитуды ответа от концентрации ТФК. Сплошная линия – результат аппроксимации экспериментальных данных уравнением Хилла (1). (В) Зависимость от концентрации ТФК скорости деактивации токов ( $\tau_{off}$ ) при ко-аппликации 2 мкМ ГАМК и ТФК, отнесённых к  $\tau_{off}$  для 2 мкМ ГАМК.

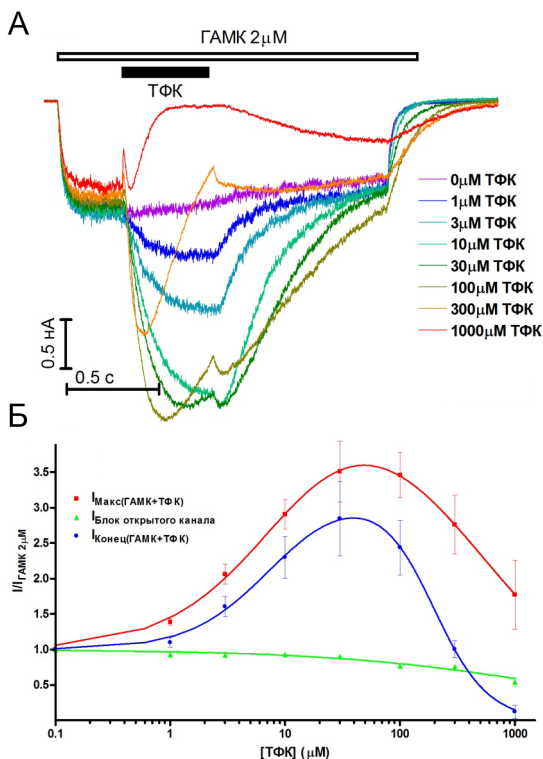


Величина  $IC_{50}$  для блокирующего эффекта ТФК составила  $620 \pm 32$  мкМ, коэффициент Хилла  $h_2 = 1.17 \pm 0.04$  ( $n = 8$ ). Под действием ТФК также заметно уменьшалась скорость деактивации токов, вызываемых ГАМК; степень замедления деактивации была пропорциональна концентрации ТФК (рис. 1В). При совместной аппликации 2 мкМ ГАМК и 100 мкМ ТФК время деактивации ( $\tau_{off}$ ) увеличивалось в  $8.28 \pm 1.29$  раз по сравнению с контролем ( $n = 6$ ).

Как видно на рис. 1, при совместной аппликации ТФК и ГАМК значительно изменялся временной ход ответа, что может отражать несколько процессов, а именно, потенциацию, блокаду, изменения степени десенситизации рецептора и другие. Для разделения этих процессов мы использовали разные способы аппликации модулятора.



**Рис. 2.** Влияние пре-аппликации ТФК на ГАМК-активируемые токи. (А) Записи ответов на 2 мкМ ГАМК в контроле и с пре-аппликацией ТФК в различных концентрациях (1-300 мкМ). На рисунке также представлена контрольная запись ответа на 2 мкМ ГАМК, которой длилась в течение всей записи (отмечена красным цветом). (Б) График зависимости от концентрации ТФК отношения максимальных токов на 2 мкМ ГАМК с пре-аппликацией ТФК к ГАМК 2 мкМ в контроле (синие квадраты). На графике также представлена концентрационная зависимость для собственных ТФК-активируемых токов, отнесённых к току, активируемому 2 мкМ ГАМК (красные кружки).



**Рис. 3.** Эффекты ТФК при аппликации в условиях постоянного присутствия ГАМК. (А) Записи токов при аппликации ТФК в концентрациях (1-1000 мкМ) на фоне постоянной аппликации 2 мкМ ГАМК и контрольная запись (только 2 мкМ ГАМК), наложенные друг на друга. (Б) Графики зависимости от концентрации ТФК токов, измеренных для точек: максимальной потенциации ТФК (красные квадраты), конца аппликации ТФК (синие кружки) и начала аппликации ТФК (зелёные треугольники) и отнесённых к токам, активируемых 2 мкМ ГАМК. Усреднённые данные по первым двум точкам аппроксимировали уравнением (6) (красная и синяя линии соответственно).

При аппликации ТФК непосредственно перед изолированной аппликацией ГАМК (рис. 2А) мы обнаружили, что ТФК потенцирует ответы на ГАМК с  $EC_{50} = 20.9 \pm 3.6$  мкМ (рис. 2Б). При высоких концентрациях ТФК (более 100 мкМ) наблюдали появление блокирующего эффекта, который выразался в снижении амплитуды ответа на 2 мкМ ГАМК по сравнению с максимально потенцированным ответом, который развивался при 100 мкМ ТФК. Рассматривая этот блокирующий эффект, необходимо учесть, что во время преаппликации

ТФК наблюдалось развитие собственного ТФК-активируемого тока с  $EC_{50} = 113 \pm 68$  мкМ, который мог способствовать входу ТФК в канал ГАМК<sub>A</sub> рецептора. В то же время при низких концентрациях (менее 30 мкМ) ТФК ее собственный ток был достаточно мал (примерно 10% от тока на 2 мкМ ГАМК). Таким образом, эти наблюдения позволяют сделать вывод о том, что потенцирующий эффект ТФК может развиваться в отсутствие активации рецептора, а наблюдаемый блок, возможно, связан с входом ТФК в канал.

Дополнительная информация о взаимодействии ТФК с ГАМК<sub>A</sub> рецептором была получена при исследовании эффектов этого фенолата в условиях постоянного присутствия ГАМК (рис. 3). Эти эксперименты показали, что при аппликации низких концентраций (1-10 мкМ) ТФК на фоне ГАМК наблюдается исключительно потенцирующий эффект. Величина  $EC_{50}$  для ТФК в этих экспериментах имела ту же величину, что и в серии с одновременной аппликацией с ГАМК ( $10 \pm 1.1$  мкМ,  $n = 8$ ). В то же время при высоких концентрациях ТФК (от 30 мкМ и более) развивались не только потенцирующие, но и блокирующие эффекты, которые состояли в появлении кратковременного блока (быстрый блок) перед развитием потенцирующего эффекта (рис. 3А). Развитие блока сопровождалось появлением «хвостового тока». При высоких концентрациях ТФК (более 100 мкМ) развивался медленный блок. Такого рода кинетика действия ТФК на фоне ГАМК может говорить о двух местах связывания ТФК в канале, которые приводят к развитию двух видов блока быстрого ( $IC_{50} = 2269 \pm 671$  мкМ) и медленного ( $IC_{50} = 193 \pm 99$  мкМ) (рис. 3Б).

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о том, что ТФК является эффективным модулятором ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. Наблюдавшееся увеличение амплитуды ответов происходило при концентрациях этого препарата, которые могут достигаться в плазме крови при его клиническом использовании [13]. Очевидно также, что было бы интересно оценить роль модуляции ГАМК<sub>A</sub> рецептора в нейропротекторных эффектах этого препарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed S., Sheraz M.A., Ahmad I. // Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol. 2018. 43: 255-319.
2. Gurpinar E., Grizzle W.E., Piazza G.A. // Clin. Cancer Res. 2014. 20(5): 1104-13.
3. Yang X., Zhang H., Qu T. et al. // J. Physiol. Sci. 2022. 72(1): 15.
4. Hill J., Zawia N.H. // Cells. 2021. 10(3): 702.
5. Subaiea G.M., Ahmed A.H., Adwan L.I., Zawia N.H. // J. Alzheimers Dis. 2015. 43(2): 425-33.
6. Subaiea G.M., Adwan L.I., Ahmed A.H. et al. // Neurobiol. Aging. 2013. 34(10): 2421-30.

7. Adwan L., Subaiea G.M., Basha R., Zawia N.H. // J. Neurochem. 2015. 133(2): 266-72.
8. Chang J.K., Leso A., Subaiea G.M. et al. // Curr. Alzheimer Res. 2018. 15(7): 655-63.
9. Halliwell R.F., Thomas P., Patten D. et al. // Eur. J. Neurosci. 1999. 11(8): 2897-905.
10. Coyne L., Su J., Patten D., Halliwell R.F. // Neurochem. Int. 2007. 51(6-7): 440-6.
11. Rossokhin A.V., Sharonova I.N., Dvorzhak A. et al. // Neuropharmacology. 2019.160: 107795.
12. Vorobjev V.S. // J. Neurosci. Methods. 1991. 38(2-3): 145-50.
13. Gee K.W., Tran M.B., Hogenkamp D.J. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. 332(3): 1040-53.

\*\*\*

## СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И У ПРОКАРИОТ

### СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ БЛОКИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

*Будаговская Н.В.*

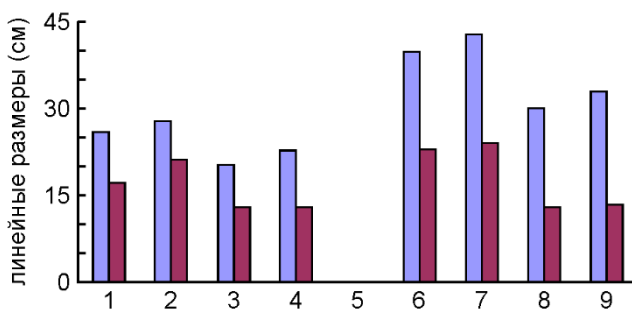
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Ионы кальция играют важную роль в сигнализации и регуляции функциональной активности растений. Антиоксиданты также являются важными компонентами систем регуляции метаболизма растений. Возможность корректирующего действия антиоксидантов на функциональную активность растений в условиях угнетения систем кальциевой сигнализации оставалась малоизученной. В данной работе исследовалось влияние антиоксиданта амбиола и блокатора кальциевых каналов верапамила на процессы роста и транспорта воды у растений кукурузы.

**Материалы и методы.** Растения кукурузы сорта Днепропетровская выращивали в специализированных камерах при температуре 25°C с 16-часовым освещением металлогалогенными лампами (20 Вт/м) в водной культуре с использованием 1/2 смеси Кнопа (рН 6.0). Амбиол и верапамил вносили в корневую зону на третьи сутки выращивания растений. Опытные варианты содержали амбиол ( $10^{-6}$  М) или верапамил ( $10^{-4}$  М) или оба соединения в тех же концентрациях. Измеряли размеры надземной части и корней в процессе выращивания растений и оценивали их состояние. Все измерения проводили в трехкратной биологической повторности. На графике представлены средние значения результатов экспериментов. Водонагнетающую активность корней оценивали по интенсивности экссудации, которую определяли по методу Anderson и House [1] с некоторыми модификациями на изолированных корнях (пятисантиметровая апикальная часть) 6-дневных проростков, помещенных в растворы верапамила ( $10^{-4}$  М), в контрольных вариантах использовали водопроводную воду без добавления верапамила. Измерения проводили в течение нескольких часов при 30°C в шестикратной биологической повторности, применялось термостатирование.

**Результаты и обсуждение.** Исследовалось влияние антиоксиданта амбиола и блокатора кальциевых каналов верапамила и их совместного действия на рост растений кукурузы. Было обнаружено, что добавление

амбиола в корневую зону растений вызывает стимуляцию роста надземной части и корней. Растения в варианте с амбиолом выше контрольных, корневая система развита лучше. Верапамил же оказывал ингибирующее действие на рост как надземной части, так и корней: растения в варианте с верапамилем значительно ниже контрольных, листья меньшего размера, корневая система развита хуже. Растения, к которым были добавлены одновременно верапамил и амбиол, имели размеры надземной части больше (высота стеблей, длина и ширина листьев), чем в варианте с верапамилем, такие растения активнее образовывали придаточные корни. Амбиол частично нейтрализовал угнетающее рост действие верапамила.

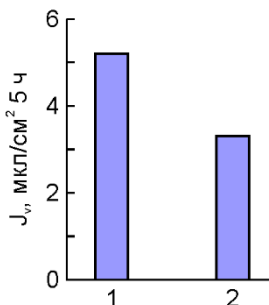


**Рис. 1.** Влияние амбиола ( $10^{-6}$  М) и верапамила ( $10^{-4}$  М) на рост надземной части и корней растений кукурузы. Светлые колонки - надземная часть, темные – корни (линейные размеры, см), 1,6 – контроль, 2,7 – варианты с амбиолом, 3,8 – варианты с верапамилем, 4,9 – варианты с амбиолом и верапамилем, 1-4 – 10-дневные растения, 6-9 – 16-дневные растения.

На рис. 1 представлены результаты экспериментов по исследованию влияния времени выращивания растений в присутствии амбиола и верапамила на рост надземной части и корней. При увеличении времени нахождения корневой системы в растворах амбиола и верапамила сохраняется отмеченная выше закономерность: амбиол активирует рост надземных органов и корней, верапамил задерживает рост этих органов по сравнению с контрольными растениями. Совместное присутствие амбиола и верапамила в корневой зоне не вызывает такое угнетение роста надземной части растений, как в варианте с верапамилем без добавления амбиола. Следует отметить, что рост корневой системы растений кукурузы в варианте с верапамилем прекращается раньше, чем рост надземной части. Это могло быть обусловлено тем, что верапамил был добавлен в корневую зону и корни имели непосредственный контакт с этим веществом.

Рост растений связан с водным обменом, поэтому были проведены эксперименты по исследованию влияния верапамила на транспорт воды.

Так как верапамил добавляли в зону корней, важно было оценить водонагнетающую активность корней в присутствии этого соединения. Было показано, что верапамил угнетал водонагнетающую активность корней (рис. 2). При этом снижение активности этого процесса было больше при увеличении времени воздействия верапамила на корневую систему. Вызванное верапамилем снижение водонагнетающей активности корней является важным фактором замедления роста этих органов и растения в целом при добавлении данного блокатора кальциевых каналов в корневую зону.



**Рис. 2.** Влияние верапамила на интенсивность экссудации корней кукурузы за 5 ч, 1 – контроль, 2 – вариант с верапамилем ( $10^{-4}$  М).

При длительном выращивании растений в присутствии верапамила на листьях образовывались некрозы, что сопряжено с генерацией активных форм кислорода. При совместном внесении верапамила и амбиола некрозы на листьях не обнаруживались. Добавление экзогенного антиоксиданта амбиола препятствовало усилению свободнорадикальных окислительных процессов, уменьшая этим негативное влияние блокатора кальциевых каналов на функциональную активность растений. Кроме того, стимулирующее рост растений действие амбиола могло быть обусловлено также усилением водного транспорта, как было отмечено нами ранее [2,3].

Таким образом, блокатор кальциевых каналов верапамил, добавленный в корневую зону растений кукурузы, вызывает угнетение процессов роста надземной части и корней, что может быть связано со снижением водонагнетающей активности корней, приводящим к уменьшению транспорта воды в надземную часть. Антиоксидант амбиол оказывает стимулирующее действие на процессы роста и транспорт воды в растениях. При совместном действии амбиола и верапамила снижение ростовой активности надземной части и корней выражено слабее, чем в варианте с верапамилем без добавления амбиола. Антиоксидант амбиол

частично нейтрализует вызванное блокатором кальциевых каналов угнетение роста растений, уменьшая обусловленное верапамилом усиление процессов свободнорадикального окисления, приводящее к деструктивным изменениям в тканях, а также за счет усиления транспорта воды в растениях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson W.P., House C.R.* // J. Exp. Bot. 1967. 18: 544.
2. *Будаговская Н.В.* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. ОАО «Центрально-черноземное книжное издательство», Воронеж. 2019. 21: 4-7.
3. *Будаговская Н.В.* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. ОАО «Центрально-черноземное книжное издательство», Воронеж. 2020. 22: 4-11.

## ГИГАНТСКИЙ БЕЛОК ГИГАНТСКИХ T4-РОДСТВЕННЫХ БАКТЕРИОВИРУСОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТРАНСДУКЦИОННЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ ОПЕРОНОВ, СОДЕРЖИТ $Ca^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН КАЛЕКСЦИТИНА

*Булавина М.К.<sup>1,2</sup>, Лу Иньхуа<sup>3,4</sup>, Зимин А.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт», Пушкино, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>3</sup>College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

<sup>4</sup>Shanghai Engineering Research Center of Plant Germplasm Resources, College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China

**Введение.** Jumbo бактериофаги – хвостатые вирусы, чья длина генома превышает 200 тысяч пар нуклеотидов, для них характерны крупные капсиды размером до 145 нм в диаметре, а в случае jumbo бактериофагов морфотипа A1 и сокращающиеся отростки, имеющие длину до 200 нм [1,2]. Например, бактериофаг РВЕСО4 имеет геном длиной 348113 пар нуклеотидов, диаметр капсида 132 нм и отросток



длиной 125 нм [3]. Близкородственные ему бактериофаги рода *Asteriusvirus*, имеют длину генома от 347152 до 386442 нуклеотидов. У некоторых из этих гигантских бактериофагов в капсиде обнаруживают вытянутое белковое тело в форме цилиндра или катушки, длиной не менее половины диаметра капсида, заключенное в геномную ДНК [1]. Можно предположить, что трансдуцирующие частицы таких jumbo фагов, имеющие крупные размеры и вмещающие большее количество генов, чем другие частицы, более мелких бактериальных вирусов, могли бы быть «супер-танкерами» для переноса чужеродной ДНК. Это может быть таргетная доставка лекарственных препаратов на основе модифицированной ДНК или РНК к клеткам, а также перенос длинных оперонов при редактировании генома бактерий [4]. Особая необходимость в переносе фрагментов ДНК большой длины возникает при применении новейшего метода мультиплексного редактирования генома, предложенного сравнительно недавно нами [5]. Часть jumbo бактериофагов является родственными классическому бактериофагу T4, инфицирующему *Escherichia coli* и имеющему геном размером около 170 тысяч пар нуклеотидов. В данной группе фагов можно выделить *Escherichia phage* РВЕСО4 рода *Asteriusvirus*, кодирующий virion structural protein, размером 3333 пар аминокислот, также присутствующий у представителей таких родов бактериофагов, как *Eneladusvirus*, *Alcyoneusvirus*, *Mimasvirus*. Такой гигантский белок не обнаруживается при пан-геномном анализе геномов других бактериофагов, родственных T4 [6].

**Постановка задачи.** Корреляция между наличием у jumbo бактериофагов белковой катушки, окруженной геномной ДНК в капсиде и кодированием их геномами гигантского по длине для бактериофагов белка побудила нас определению функции этого белка и его гомологов методами биоинформатики.

Мы также предполагаем, что нарушение структуры белкового тела путем нокаута гена участвующего в его образовании, открывает возможность увеличения ёмкости капсида бактериофагов рода *Asteriusvirus* и других jumbo фагов при образовании трансдуцирующих частиц, более того может привести к конструированию метода получения трансдуцирующих частиц без контаминации частицами jumbo бактериофагов дикого типа.

Понимание структуры и упаковки генома у jumbo бактериофагов необходимо также для изучения трансдукции ДНК в океане такими трансдуцирующими частицами – «супер-танкерами», а также для разработки методов хранения библиотек генетических последовательностей.

**Результаты.** В базе данных nr (non-redundant protein sequences) с помощью алгоритма BLASTp мы нашли 46 аминокислотных последовательностей гомологичных virion structural protein бактериофага РВЕСО4 длиной 3333 а.к.

Например, jumbo бактериофаг *Ralstonia phage RsoM2USA*, длина генома которого составляет 343806 пар нуклеотидов имеет hypothetical protein, длиной 2540 пар аминокислот, гомологичный белку длиной 3333 фага РВЕСО4. Проанализировав его с помощью SWISS-MODEL, мы заметили сходство с кальций - связывающим доменом белка калексцитина. Данный домен имеет координаты: 90-145 по последовательности белка фага [7-11]. В структуре молекулы преобладают  $\alpha$ -спирали, образующие «EF-руки», общая структура весьма компактна и имеет ярко выраженное гидрофобное ядро между N- и C- концевыми доменами (рис. 1).



**Рис. 1.** Модель района 90-145 аминокислотной последовательности белка virion structural protein бактериофага РВЕСО4, построенная на основе структуры кальций-связывающего домена белка калексцитина

В данном исследовании с помощью SWISS-MODEL было обнаружено структурное сходство на C-конце virion structural protein бактериофага РВЕСО4 с ДНК-хеликазами [7-11]. Возможно, эта функция также связана с образованием внутренней катушки капсида jumbo бактериофагов и упаковкой фаговой ДНК. Также с помощью программы PSI-BLAST в середине аминокислотной последовательности белка virion structural protein бактериофага РВЕСО4 длиной 3333 а.к. обнаруживается

некоторое сходство с порталным белком бактериофага T4 и его родственников. Все эти находки позволяют предположить, что данная длинная аминокислотная последовательность является полибелком и подвергается протеолитическому процессингу во время развития фага.

**Заключение.** Скорее всего белок virion structural protein бактериофага РВЕСО4 длиной 3333 а.к. и его гомологи представляют собой полибелки, что ранее не было показано для бактериовирусов, имеющих отростки. Этот полибелок вполне может содержать белки или функциональные домены, участвующие в сборке внутренней катушки jumbo бактериофагов. Введение термочувствительных либо нонсенс - мутаций в ген этого белка для увеличения емкости трансдуцирующих частиц на основе jumbo бактериофагов в этом случае невозможно, т.к. могут быть потеряны функции, существенные для нормального развития и сборки частиц jumbo бактериофагов. Учитывая найденное нами, определенное разнообразие в длине этих гигантских белков можно предположить, что введение делеций в ген белка virion structural protein длиной 3333 а.к. фага РВЕСО4 и других представителей рода *Asterivirus*, не затрагивающих систему созревания этого белка может обеспечить поставленную задачу. Данный подход требует на первой стадии – подробного изучения функций, кодируемых этой большой аминокислотной последовательностью методами биоинформатики.

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00669, <https://rscf.ru/project/22-25-00669/>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Yuan Y., Gao M. // *Front. Microbiol.* 2017. 8: 403.
2. Laughlin T.G., Deep A., Prichard A.M. et al. // *Nature.* 2022. 608(7922): 429-35.
3. Kim M.S., Hong S.S., Park K., Myung H. // *Arch. Virol.* 2013. 158(11): 2399-403.
4. Yacoby I., Shamis M., Bar H. et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2006. 50(6): 2087-97.
5. Zhao Y., Tian J., Zheng G. et al. // *Sci. China Life Sci.* 2020. 63(7): 1053-62.
6. Nikulin N.A., Zimin A.A. // *Front. Microbiol.* 2021. 12: 632686.
7. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M. et al. // *Sci. Rep.* 2017. 7(1): 10480.
8. Bienert S., Waterhouse A., de Beer T.A. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2017. 45(D1): D313-9.
9. Studer G., Rempfer C., Waterhouse A.M. et al. // *Bioinformatics.* 2020. 36(6): 1765-71.
10. Studer G., Tauriello G., Bienert S. et al. // *PLoS Comput Biol.* 2021. 17(1): e1008667.
11. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(W1): W296-303.

## СТИГМАСТЕРИН – СТРЕССОВЫЙ СТЕРИН РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

*Валитова Ю.Н.<sup>1</sup>, Хабибрахманова В.Р.<sup>1,2</sup>, Бабаев В.М.<sup>3</sup>, Уваева В.Л.<sup>1</sup>, Ренкова А.Г.<sup>1</sup>, Галеева Е.И.<sup>1</sup>, Рахматуллина Д.Ф.<sup>1</sup>, Минибаева Ф.В.<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия

<sup>3</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

**Введение.** Проблема стрессовой устойчивости живых организмов является предметом пристального внимания исследователей в течение многих лет. В связи с этим, повышенный интерес ученых вызывают организмы – экстремофилы, способные выживать в экстремальных условиях, чрезвычайно неблагоприятных для других организмов, посредством уникальных механизмов устойчивости. К таким организмам относятся высшие несосудистые растения бриофиты (мхи), а также симбиотические организмы лишайники. Мхи являются одними из древнейших наземных организмов и представляют собой ветвь эволюции высших растений. Несмотря на то, что мохообразные являются минорными компонентами большинства наземных экосистем, они доминируют на территориях с неблагоприятными климатическими условиями, например, в арктических, субарктических широтах, в Антарктике, засушливых степях. Растения, произрастающие в этих местах, подвергаются серьезным абиотическим стрессовым воздействиям, таким как обезвоживание, перепады температур и ультрафиолетовая радиация. Известно, что мхи обладают устойчивостью к высокой температуре, поеданию их насекомыми, млекопитающими и микроорганизмами и низкую потребность в питательных веществах. Лишайники, которые представляют собой симбиотические ассоциации между грибами (микобионтами) и водорослями или цианобактериями (фотобионтами), также являются примером организмов-экстремофилов. Вследствие того, что лишайники представлены несколькими разными компонентами и обладают специфическими особенностями морфологии, анатомии и физиологии, они отличаются большей устойчивостью к неблагоприятным

условиям среды по сравнению с высшими растениями, причем могут существовать там, где не выживают другие фотосинтезирующие организмы.

Высокая стрессовая устойчивость экстремофилов может быть обусловлена, в том числе, наличием в их организме большого количества вторичных метаболитов, среди которых разнообразны по структуре терпены, фенолы, необычные жирные кислоты, а также стерины [1]. Мхи содержат большое количество свободных стерinov и эфиров стерinov. Интересно, что состав стерinov мхов отличается от такового высших сосудистых растений. Информация об особенностях стеринового профиля и роли стерinov в стрессовой устойчивости мхов весьма малочисленна. Анализ GC-MS показал, что *P. patens* содержит стигмастерин в качестве основного стерина (56-60% от общего содержания стерinov) и  $\beta$ -ситостерин в меньшей степени (8-12%); в отличие от высших сосудистых растений, в которых стигмастерин содержится в меньших количествах [2]. Такие отличия в соотношении основных молекулярных видов стерinov могут быть обусловлены специфическими функциями этих соединений.

Стериновый состав лишайников представлен уникальными видами стерinov [3]. В лишайниках был обнаружен широкий спектр стерinov, преимущественно являющихся спиртами и кетонами. Холестерин присутствует во многих видах лишайников, как минорный компонент.  $\beta$ -Ситостерин, являющийся преобладающим стеринном растений, обнаружен только в двух видах лишайников. Основным стеринном грибной плазматической мембраны в лишайниках является эргостерин, который можно рассматривать как маркер метаболической активности грибов [4]. В лишайнике *Lobaria pulmonaria* (порядок Пельтигеровые) показано наличие лихестерина, эпистерина, пекостерина и несколько форм стигмастерина. Возможно, столь богатый стериновый профиль Пельтигеровых лишайников вносит вклад в формирование их стрессовой устойчивости. Необходимо отметить, что Пельтигеровые лишайники являются обособленным отделом лишайников, которых относят к отдельной ветви лишайникового сообщества. В отличие от остальных лишайников для них характерны высокие темпы роста и высокие индексы метаболической активности.

Известно, что растения, в отличие от животных, обладают сложным составом стерinov, многообразие которого определяет широкий спектр функций стерinov в жизнедеятельности растений [5,6]. В настоящее время становится ясно, что наряду со своими структурными функциями стерины играют важную регуляторную роль в различных внутриклеточных процессах. Стерины также являются основными компонентами липидных рафтов, мембранных микродоменов, участвующих в передаче клеточного сигнала. Преобладающими мембранными стеринами высших растений являются  $\beta$ -ситостерин, кампестерин, стигмастерин. Растительные

стерины являются важными структурными компонентами мембран, которые могут определять их механические свойства. Изменения в содержании и составе стерина могут влиять на проницаемость мембраны, порядок углеводородной цепи, эффективность конденсации и эластичность [7]. Каждый тип стерина может по-разному влиять на проницаемость липидного слоя плазмалеммы из-за различий в химическом строении.

Стигмастерин структурно близок к  $\beta$ -ситостерину, но отличается наличием транс-ориентированной двойной связи в положении С-22 его боковой цепи, что делает его более ненасыщенным. Согласно Wagatsuma (2017), эта структурная особенность стигмастерина способствует увеличению проницаемости мембран для воды и ионов [8]. Еще одной особенностью химической структуры стигмастерина является наличие, как и у  $\beta$ -ситостерина, этильной группы в положении С24. Предполагается, что наличие дополнительной этильной группы может усиливать ван-дер-ваальсовы взаимодействия, приводя к большей плотности мембран и, например, к меньшей температурной чувствительности. По мнению Dufourc [9],  $\beta$ -ситостерин и стигмастерин можно назвать «регуляторами мембранной динамики», которые поддерживают мембрану в оптимальном состоянии, необходимом для функционирования клеток при неблагоприятных температурах. Стигмастерин сам по себе не обладает способностью повышать упорядоченность мембраны, в то время как  $\beta$ -ситостерин и кампестерин способствуют ее упорядоченности. Тем не менее, взаимодействуя с гликозилнозитолфосфоцерамидом, одним из основных сфинголипидов в растении, стигмастерин может повышать упорядоченность в мембране, тогда как взаимодействие с глюкозилцерамидом снижает ее [10]. Таким образом, изменение содержания стигмастерина может прямо или косвенно изменять характеристики мембран через изменение содержания и состава других мембранных липидов, таким образом, оказывая влияние на метаболические процессы в мембранах и активность связанных с мембраной белков, участвующих в передаче сигналов [11,12].

В настоящее время биохимические механизмы стрессовой устойчивости экстремофилов, опосредованные изменением состояния клеточных мембран и изменениями профиля стерина, изучены недостаточно полно и не систематизированы. В связи с этим, актуальным является идентификация стерина в организмах-экстремофилах и выявление изменений в их профиле при действии стрессовых факторов.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение и анализ изменений стеринового состава организмов-экстремофилов – мха *Hylocomium splendens* и пельтигерового лишайника *Lobaria pulmonaria* в условиях температурного стресса.

**Материалы и методы. Объекты исследования.** В качестве объектов исследования были использованы мох *Hylocomium splendens*, произрастающий в лесах Айшинского лесничества Республики Татарстан, и лишайник *Lobaria pulmonaria*, собранный в лесах в окрестностях г. Сыктывкар Республики Коми.

**Стрессовая обработка.** Побегов мха и талломы лишайников обрабатывали низкой отрицательной температурой ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) путем помещения в морозильную камеру на 1 час после предварительной гидратации (напитывания водой) материала. Для создания высокотемпературного стресса побегов гидратированного мха прогревали в камере при  $+30^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч. Лишайник обрабатывали температурой  $+40^{\circ}\text{C}$  также в течение 3 ч. Все условия стрессовой обработки были предварительно экспериментально подобраны.

**Методы. Измерение проницаемости мембран.** Об изменении проницаемости мембран судили по выходу электролитов из клеток, который оценивали по изменению электропроводности инкубационного раствора с помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия), далее рассчитывали индекс мембранной стабильности (ИМС).

**Анализ стеринового профиля.** Исследование проводили с помощью ВЭТСХ на лабораторном инструментальном комплексе (CAMAG, Швейцария). Для хроматографии использовали ТСХ пластины (Cat.N 1.05626.0001, Merck KGaA, Германия). Нанесение экстрактов и стандартов на ТСХ-пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 в виде треков шириной 7 мм. Разделение липофильных соединений проводили в автоматической камере для элюирования ADC 2, линия фронта подвижной фазы – 80 мм. В качестве подвижной фазы использовали гексан:этиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1). Далее ТСХ-пластины опрыскивали 5% раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в этаноле с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия), высушивали и нагревали 20 мин при температуре  $150^{\circ}\text{C}$ . Денситометрическое сканирование ТСХ-пластин после дериватизации проводили на TLC Scanner 4 при параметрах: режим – отражательная абсорбция, длина волны – 490 нм, щель –  $6.00 \times 0.40$  мм, скорость сканирования – 20 мм/с, разрешение – 100 мкм/шаг, математический фильтр Savitsky-Golay 7.

**Результаты и обсуждение.** В последние годы появилась информация о том, что стигмастерин является «стрессовым» стеринном. Aboobucker and Suza [13] рассмотрели закономерности накопления стигмастерина в растениях в ответ на различные стрессы. При взаимодействии растений и патогенов синтез стигмастерина происходит при восприятии патогена и опосредуется такими соединениями, как флагеллин, полисахариды и активные формы кислорода (АФК) [14]. Было также продемонстрировано, что содержание стигмастерина увеличивается

в ответ на повреждение, например, механическое удаление стебля растения [15], а также при гравитропизме [16]. До настоящего времени тонкие механизмы вовлечения стигмастерина в стрессовые ответы остаются не раскрытыми.

Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования, посвященные изучению возможных механизмов участия стигмастерина в стрессовых ответах растительных клеток. Было показано, что действие низкой температуры на проростки пшеницы приводило к увеличению проницаемости плазмалеммы для ионов, изменению редокс-статуса клеток и увеличению уровня стигмастерина [17]. Было обнаружено, что уровень транскриптов C22-стерин десатуразы выше в корнях при действии холода, чем в листьях, что свидетельствует об органоспецифичности «стеринового» ответа в проростках пшеницы на действие низкой температуры [18]. Исследование действия фитогормонов на уровень стигмастерина показало, что при действии АБК и СК на проростки пшеницы были выявлены наиболее заметные изменения содержания стигмастерина [19]. Получены предварительные данные о том, что действие повышенной температуры приводит к снижению энергетических показателей и снижению жизнеспособности, но не вызывает заметных изменений в содержании стигмастерина, а стрессовая обработка проростков пшеницы засолением, напротив, сопровождается увеличением содержания стигмастерина в клетках (Валитова с соавторами, данные не опубликованы).

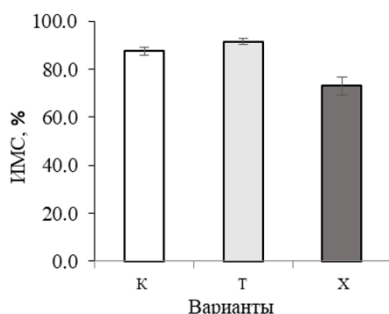
Таким образом, проведенные нами ранее исследования привели нас к заключению, что при действии различных стрессовых факторов в проростках пшеницы наблюдается изменение уровня стигмастерина, однако степень этих изменений зависит от характера воздействия. Наибольшие изменения этого стерина наблюдались при действии засоления, низкой положительной температуры, при раневом стрессе, что может свидетельствовать о вовлечении стигмастерина в стрессовые ответы растительных клеток.

Анализ литературных данных показал, что организмы-экстремофилы зачастую обладают разнообразным стериновым составом, не характерным для обычных растений, например, у некоторых видов мхов обнаружено высокое содержание стигмастерина, а у некоторых видов лишайников выявлен очень широкий спектр необычных стеринов и также показано наличие нескольких форм стигмастерина. В связи с этим следующим этапом наших исследований стало изучение и анализ изменений стеринового состава организмов-экстремофилов – мха *Hylocomium splendens* и пельтигерового лишайника *Lobaria pulmonaria* в условиях температурного стресса. В настоящей работе была проведена оценка состояния клеточных мембран мха и лишайника путем измерения их



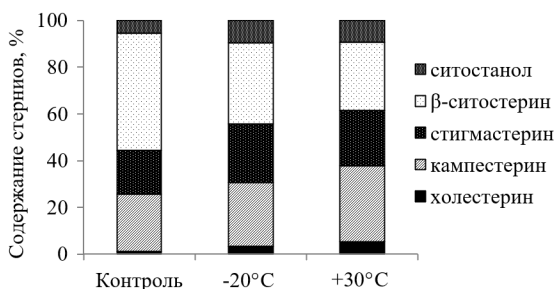
проницаемости для электролитов и расчета индекса мембранной стабильности (ИМС) при действии неблагоприятных температур. Далее методом ВЭТСХ был осуществлен анализ стеринового профиля экстремофилов при обработке неблагоприятными температурами.

Результаты проведенных экспериментов показали, что действие повышенной температуры практически не оказывало влияния на выход электролитов в тканях мха (рис. 1), а действие пониженной температуры, напротив, приводило к значительному увеличению выхода электролитов и снижению индекса мембранной стабильности, что может свидетельствовать о повреждающем действии пониженной температуры на клеточные мембраны мха (рис. 1).



**Рис. 1.** Индекс мембранной стабильности (ИМС) мха *H. splendens* при действии повышенной (Т) и пониженной температуры (Х).

Количественный анализ стеринов мха *H. splendens* при температурном стрессе показал, что относительный уровень стеринов незначительно уменьшался при низкой отрицательной температуре, однако наблюдались практически однонаправленные изменения в соотношении основных молекулярных видов стеринов (рис. 2) и количества стрессового стерина стигмастерина (табл. 1). При температурном стрессе наблюдалась общая тенденция увеличения доли стигмастерина (в 1.4 раза), ситостанола (в 2 раза), холестерина (в 3-5 раз), при этом наблюдалось уменьшение доли  $\beta$ - ситостерина (рис. 2). Доля кампестерина незначительно повышалась при низкой отрицательной температуре и увеличивалась в 1,3 раза при повышенной положительной температуре. По полученным данным видно, что температурное воздействие приводит к изменениям в соотношении основных молекулярных видов стеринов во мхе *H. splendens*, причем при низкой отрицательной температуре наблюдаются наиболее существенные изменения в составе стеринов.



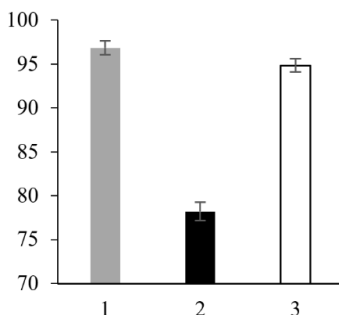
**Рис. 2.** Содержание молекулярных видов стеринов мха *H. splendens* при температурном стрессе в процентном соотношении от общего количества стеринов. Представлены данные среднеарифметических значений из трех независимых повторностей. Относительное стандартное отклонение среднего не превышало 5%.

**Табл. 1.** Количество стигмастерина во мхе *H. splendens* при стрессовых воздействиях.

Воздействие	Количество стигмастерина, мкг/г*
Контроль	4.96 ± 0.17
-20°C	5.32 ± 0.18
+30°C	5.47 ± 0.30

Количественный анализ стеринов мха *H. splendens* при температурном стрессе показал, что относительный уровень стеринов незначительно уменьшался при низкой отрицательной температуре, однако наблюдались практически однонаправленные изменения в соотношении основных молекулярных видов стеринов (рис. 2) и количества стрессового стерина стигмастерина (табл. 1). При температурном стрессе наблюдалась общая тенденция увеличения доли стигмастерина (в 1.4 раза), ситостанола (в 2 раза), холестерина (в 3-5 раз), при этом наблюдалось уменьшение доли β- ситостерина (рис. 2). Доля кампестерина незначительно повышалась при низкой отрицательной температуре и увеличивалась в 1,3 раза при повышенной положительной температуре. По полученным данным видно, что температурное воздействие приводит к изменениям в соотношении основных молекулярных видов стеринов во мхе *H. splendens*, причем при низкой отрицательной температуре наблюдаются наиболее существенные изменения в составе стеринов.

Исследование воздействия экстремальных температур на талломы лишайника *L. pulmonaria* показало, обработка повышенной и пониженной температурами приводила к увеличению выхода электролитов из клеток и снижению индекса мембранной стабильности (рис. 3), что так же как и у мха, свидетельствует о повреждении мембран клеток таллома лишайника.



**Рис. 3.** Индекс мембранной стабильности (%) после выдерживания талломов лишайника *L. pulmonaria* при экстремальных температурах. 1 – контроль, 2 – +40°C (3 ч); 3 – -20°C (1 ч).

**Табл. 2.** Состав и содержание стеринов, их предшественников и производных в экстрактах образцов лишайника *Lobaria pulmonaria*, обработанных неблагоприятными температурами ( $n = 3$ ).

$R_f$	Содержание, %*			Отнесение
	контроль	(-20°C)	(+40°C)	
0.16	5.12 ± 1.20	4.59 ± 1.85	8.25 ± 1.06	стерины**
0.20	5.84 ± 0.75	5.95 ± 1.14	4.45 ± 0.82	терпеноиды**
0.90	12.88 ± 2.12	13.21 ± 1.30	12.10 ± 2.77	эфирь стеринов***
0.98	8.54 ± 1.62	6.87 ± 0.95	4.16 ± 1.54	углеводороды, в т.ч. сквален**

**Табл. 3.** Абсолютное содержание стеринов и их предшественников в экстрактах образцов лишайника *Lobaria pulmonaria*, обработанных неблагоприятными температурами.

Количество, мкг/г СВ	Варианты		
	Контроль	(-20°C)	(+40°C)
Стерины	448 ± 150	615 ± 191	502 ± 247
Тритерпены	444 ± 269	645 ± 282	178 ± 24
Углеводороды, в том числе сквален	570 ± 125	509 ± 103	147 ± 30

Данные, полученные с помощью ВЭТСХ, показали, что относительное содержание общего пула стеринов в лишайнике *L. pulmonaria* значительно возрастает при действии повышенной температуры и не изменяется при действии отрицательной температуры. Уровень содержания предшественников стеринов, терпеноидов, практически не изменялся при действии неблагоприятных температур. Относительное содержание другого предшественника стеринов сквалена значительно снижалось при действии повышенной температуры и слегка уменьшалось при обработке отрицательной температурой. Уровень содержания производных стеринов, в частности эфиров стеринов, практически не изменялся при действии неблагоприятных температур. Данные по изменениям абсолютного содержания стеринов и их

предшественников в лишайнике *L. pulmonaria* показали, что при действии повышенной температуры на *L. pulmonaria* наблюдалось заметное увеличение содержания стеринов, небольшое снижение уровня тритерпенов и заметное снижение уровня сквалена. При обработке отрицательной температурой происходило небольшое увеличение содержания стеринов и тритерпенов, уровень сквалена оставался неизменным (табл. 3).

Таким образом, на основании полученных результатов можно прийти к заключению, что стериновый состав организмов-экстремофилов на примере мха *H. splendens* и лишайника *L. pulmonaria* динамично реагирует на действие неблагоприятных температур, что свидетельствует о вовлечении стеринового компонента в стрессовый ответ растительных организмов. Стресс-индуцированное изменение уровня стигмастерина у мха *H. splendens* при температурной обработке может свидетельствовать об участии стигмастерина в формировании устойчивости мха к неблагоприятным температурам.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00362.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Asakawa Y., Ludwiczuk A. // Methods Mol. Biol. 2013. 1055: 1-20.
2. Morikawa T., Saga H., Hashizume H., Ohta D. // Planta. 2009. 229(6): 1311-22.
3. Dembitsky V.M., Tolstikov G.A. Organic metabolites of lichens. Novosibirsk: Publishing house of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. 2005. branch "Geo" 135 p.
4. Dahlman L., Näsholm T., Palmqvist K. // New Phytol. 2001. 153: 307-15.
5. Benveniste P. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. 55: 429-57.
6. Darnet S., Schaller H. // Molecules. 2019. 24: 451.
7. Bernsdorff C., Winter R. // J. Phys. Chem. B. 2003. 107: 10658-64.
8. Wagatsuma T. // Soil Science and Plant Nutrition. 2017. 63: 507-16.
9. Dufourc E.J. // Plant Signal Behav. 2008. 3: 133-4.
10. Grosjean K., Mongrand S., Beney L. et al. // J. Biol. Chem. 2015. 290: 5810-25.
11. Schuler I., Milon A., Nakatani Y. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. 88: 6926-30.
12. Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S. // Plant Signal Behav. 2013. 8(2): e23142-1-5.
13. Aboobucker S.I., Suza W.P. // Front. Plant Sci. 2019. 10: 354.
14. Griebel T., Zeier J. // Plant J. 2010. 63: 254-68.
15. Han P.P., Zhou J., Yuan Y.J. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2009. 54: 105-12.
16. Dalal J., Lewis D.R., Tietz O. et al. // J. Plant Physiol. 2016. 196-197: 28-40.
17. Valitova J., Renkova A., Mukhitova F. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2019. 142: 452-9.
18. Renkova A., Valitova J., Schaller H., Minibayeva F. // Biologia Plantarum. 2019. 63: 59-69.
19. Renkova A.G., Khabibrakhmanova V.R., Valitova J.N. et al. // Russ. J. Plant Physiol. 2021. 68: 474-82.

# РОЛЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ПОГЛОЩЕНИЯ КВАНТОВ СВЕТА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИМ АППАРАТОМ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

*Ветошкина Д.В., Балашов Н.В., Борисова-Мубаракшина М.М.*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

**Введение.** При изменении освещенности растений оптимизация фотосинтетической активности на стадии поглощения энергии квантов света происходит за счет изменений в структурно-функциональных характеристиках светособирающих антенных комплексов. Механизм краткосрочной адаптации, *state transitions*, запускается в первые минуты освещения, а механизм долгосрочной адаптации включается при длительном воздействии измененной освещенности, более трех дней. Процесс *state transitions* заключается в миграции внешней части светособирающей антенны фотосистемы 2 (ФС2) между ФС2 и фотосистемой 1 (ФС1), что приводит к перераспределению поглощения световой энергии фотосистемами. При долгосрочной адаптации к условиям повышенной освещенности происходит подавление биосинтеза периферических белков антенны и, как следствие, уменьшение размера антенны ФС2, что приводит к уменьшению количества поглощаемых квантов света и позволяет избежать фотоингибирования, оптимизируя работу фотосинтетического аппарата.

При этом, при повышенной освещенности происходит ингибирование процесса *state transitions*, т.е. краткосрочного адаптационного ответа. Однако являются ли процессы краткосрочной и долгосрочной адаптации взаимосвязанными и какова молекулярная природа сигналов для регуляции этих процессов долгое время оставалось невыясненным.

Известно, что повышение освещенности приводит к увеличению образования активных форм кислорода (АФК) в растительных клетках, причем увеличение образования АФК происходит в основном за счет возрастания их продукции в хлоропластах [1]. Ранее нами было показано, что именно пероксид водорода является сигналом, запускающим регуляцию размера светособирающей антенны ФС2 при длительной повышенной освещенности [2].

Целью данной работы было исследовать влияние пероксида водорода на процесс *state transitions* в листьях высших растений.

**Результаты.** Первым этапом процесса *state transitions* является активация фермента STN7 киназа, который осуществляет

фосфорилирование белков светособирающей антенны ФС2 – Lhcb1 и Lhcb2. Накопление данных белков в фосфорилированной форме приводит к их отталкиванию от ФС2, к миграции антенных комплексов, содержащих эти белки, и их присоединению к ФС1.

Для исследования влияния пероксида водорода на активность STN7 киназы оценивали накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в присутствии и отсутствии пероксида водорода в реакционной смеси при освещении. Объектом исследования были интактные тилакоиды, выделенные из листьев *Arabidopsis thaliana* [3]. Оценку накопления фосфорилированных белков проводили с помощью вестерн-блот анализа.

Было показано подавление светозависимого накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 при добавке 250 и 500 мкМ пероксида водорода. При обеих концентрациях пероксид водорода не оказывал влияния на скорость электронного транспорта в изолированных тилакоидах, а также на значения максимального и эффективного квантовых выходов ФС2.

В тилакоидной мембране *Arabidopsis thaliana* обнаружена еще одна киназа - STN8, осуществляющая фосфорилирование белков коровой части ФС2, в частности белка D1. Максимальное накопление этих белков в фосфорилированной форме происходит на высоком свете, то есть в тех условиях, когда в хлоропластах происходит генерация пероксида водорода с высокой скоростью. В нашей работе показано, что добавка пероксида водорода на свету не приводит к уменьшению содержания фосфорилированного белка D1, что означает, что данная киназа не ингибируется пероксидом водорода.

Ингибирование активности STN7 киназы пероксидом водорода должно приводить не только к снижению количества фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2, но и, к ингибированию перехода внешней части антенны ФС2 между фотосистемами. Классическим способом оценки протекания state transitions является измерение низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a*. При температуре жидкого азота происходит регистрация флуоресценции хлорофилла обеих фотосистем, что позволяет следить не только за диссоциацию внешней антенны ФС2, но и за ее присоединением к ФС1. Измерения спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a* показали ингибирование миграции антенных комплексов от ФС2 к ФС1 добавкой пероксида водорода.

Таким образом, в работе впервые показано ингибирование процесса state transitions пероксидом водорода. Возрастание количества пероксида водорода при повышении освещенности препятствует переходу светособирающих комплексов от ФС2 к ФС1, что может быть необходимо для их протеолиза и уменьшения размера светособирающей антенны ФС2, учитывая предполагаемую в литературе локализацию протеазы вблизи ФС2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mubarakshina M.M., Ivanov B.N. et al. // J. Exp. Bot. 2010. 61(13): 3577-87.
2. Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Vetoshkina, D.V. et al. // J. Exp. Bot. 2015. 66(22): 7151-64.
3. Casazza A.P., Tarantino D., Soave C. // Photosynthesis research. 2001. 68: 175-80.

### ОСНОВНЫЕ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ СИГНАЛИНГА АУКСИНА И ИХ РАЗЛИЧИЯ У МОНО-, ДИ- И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВАРИАНТОВ КАРТОФЕЛЯ

*Ломин С.Н., Колачевская О.О., Архинов Д.А., Романов Г.А.*

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,  
Москва, Россия

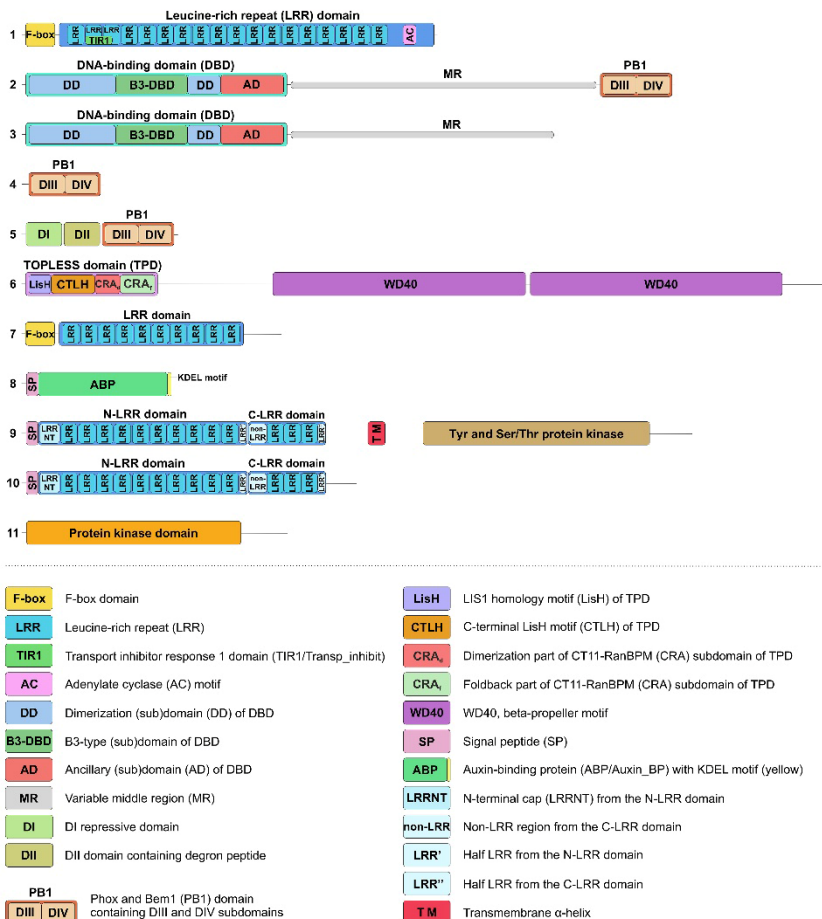
**Введение.** Клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) хорошо известны как широко распространенные источники пищевых, кормовых и технических веществ (крахмала). Ауксин, классический растительный гормон, способствует образованию клубней картофеля, по крайней мере, в системе *in vitro* [1,2]. Поэтому гормональная система ауксина привлекает постоянный интерес исследователей картофеля. Механизм действия ауксина с участием F-box белков (ортологов белков TIR1/AFB) в качестве главных рецепторов был раскрыт на модели арабидопсиса [3]. При низких концентрациях ауксина факторы транскрипции ARF неактивны, их блокируют репрессорные белки Aux/IAA. Последние связывают белки TPL/TPR, которые взаимодействуют с гистоновой деацетилазой HDAC, работа которой делает хроматин транскрипционно неактивным. При добавлении ауксина образующийся тройной комплекс ауксин-рецептор-Aux/IAA приводит к убиквитинированию последнего с участием комплекса убиквитин-лигазы SCF-E3 с последующей деградацией Aux/IAA в протеасомах. Высвобожденные транскрипционные факторы ARF связываются с промоторами генов первичного ответа, например, с Aux/IAA. Дополнительно к описанному, многие неканонические белки Aux/IAA, не имеющие домена ДП для распознавания ауксинового рецептора с гормоном, тем не менее, вовлечены в ауксиновую сигнализацию, конкурируя за связывание с транскрипционными факторами. Однако на сегодняшний день открыты реальные альтернативные механизмы действия ауксина, совершенно независимые от канонического пути. Один из таких путей основан на способности ARF3 (ETTIN) связывать ауксин при высокой концентрации и переходить в активное состояние [4,5]. Очень быстрые клеточные эффекты ауксина могут быть TIR1/AFB-независимыми. У арабидопсиса ауксин-

связывающий белок AVP1 связывает природный ауксин IAA при низком значении pH, характерном для апопласта, куда секретруется часть пула AVP1 [6]. Сигнальный модуль AVP1-TMK1 (transmembrane kinase 1) на поверхности клетки необходим для быстрого глобального фосфо-ответа на ауксин. Другой альтернативный механизм основан на свойствах белка, ассоциированного с S-фазовыми киназами (SKP2A), F-box белка, гомологичного ауксиновому рецептору AFB и также локализованного в ядрах [7]. Основными мишенями для SKP2A являются транскрипционные факторы – E2FC и DPB – специфические ингибиторы клеточного митоза. В настоящей работе проведено структурно-функциональное исследование генов и белков ауксиновой сигнализации картофеля разных генотипов: дублированного моноплоида Phureja (DM), гетерозиготной диплоидной линии *S. tuberosum* (RH) и коммерческого тетраплоида Otava, геном которого также полностью секвенирован [8]. Такой большой охват позволил нам отобразить правдоподобную картину сложной ауксиновой сигнализации, используя картофель в качестве модельного растения.

**Результаты и обсуждение.** Мы подтвердили наличие пяти рецепторов ауксина семейства TIR1/AFB в гаплоидном геноме картофеля DM. Их гены расположены достаточно равномерно с тремя экзонами, кодирующими белки длиной 580-622 аминокислотных (aa) остатков (рис. 1). Все рецепторы имеют два домена в структуре белка. На N-конце находится F-box<sub>5</sub> (PF18511.3), LRR-домен с многочисленными лейцин-богатыми повторами. У картофеля DM есть ортологи (StTIR1a,1b,1c) рецепторов AtTIR1 и AtAFB1, но нет ортологов рецепторов AtAFB2,3 арабидопсиса. Кроме того, картофель обладает одним ортологом группы AtAFB4,5, StAFB4, а также представителем особой группы, StAFB6. Последняя группа отсутствует у арабидопсиса. В недавно секвенированном геноме тетраплоидного сорта картофеля Otava было идентифицировано 13 канонических генов рецепторов ауксина. Каждому гену DM соответствовали два или три практически идентичных ему по структуре ортолога Otava.

В геноме DM картофеля нами идентифицировано 24 гена ARF. ARF-белки функционально и филогенетически можно разделить на четыре клады. Одна из них объединяет ARF-активаторы, которые образуют отдельную филогенетическую группу. Сказанное выше о роли ARF в ауксиновой сигнализации как нельзя лучше подходит для них. В целом, эти белки включают три основных региона: на N-конце – DBD (DNA Binding Domain), в середине - нерегулярный MR (Middle Region, PF06507.15) и на C-конце – PB1 (Phox and Bem1) домен (PF02309.18). Первая область отвечает за взаимодействие с промоторами, а последняя представляет собой домен для димеризации с ARF и с Aux/IAA.





**Рис. 1.** Структура компонентов передачи ауксинового сигнала. 1. StTIR1, StAFB – рецепторы ауксина. 2. StARF5, 6a, b, 8a, b, c, 19a, b, StARF4 – стимуляторы транскрипции; StARF1, 2a, b, 18a, b, c – ингибиторы транскрипции. 3. StARF13 – ингибитор транскрипции без PB1-домена; StARF3 – ETTIN-like, вероятный рецептор ауксина; StARF10a, b, c, 16, 17 – неканонические ARF. 4. StARF11 – неканонический ARF. 5. StIAA – ингибиторы передачи сигнала. 6. StTPL, StTPRs – транскрипционные ингибиторы. 7. StSKP2A/B – белок, ассоциированный с S-фазовыми киназами. 8. StABP1 – вероятный рецептор ауксина. 9. StTMK1a, b, 4a, b, c, 5a, 5b, 5c – трансмембранный серин-треониновые киназы. 10. StTMK1c – ТМК без серин-треониновой киназы. 11. StMPK\_1, \_2 – MAP-киназы.

Мы обнаружили девять функциональных активирующих ARF в DM картофеля: StARF5, 6a, 6b, 8a, 8b, 8c, 19a, 19b и 19c. В тетраплоиде Отава было обнаружено 56 генов ARF, из которых 20 принадлежат к сходной группе. Вторую группу образуют ингибиторные ARF, которые подавляют экспрессию генов-мишеней. Эта группа включает 7 представителей в DM картофеля. В целом они имеют ту же структуру из трех доменов, что и активаторы ARF. Однако один из белков, StARF13, имеет значительные аномалии во всех доменах. Соответственно, остается шесть полностью функциональных ARF этой группы: StARF1, 2a, 2b, 18a, 18b и 18c. У картофеля сорта Отава мы обнаружили 12 ARF этой группы, 11 из которых имеют каноническую структуру. В третьей небольшой кладе находится StARF3, ортолог ARF3/ETT неканонического пути передачи сигнала ауксина. Остальные белки ARF не имеют канонической структуры, необходимой для передачи сигнала.

Наконец, третий компонент канонического ауксинового сигнального пути, белки Aux/IAA, у картофеля DM кодируется 25 генами. Они содержат три основных домена: DI (EAR), DII (Degron) и PB1. DI, он же EAR, содержит мотив LxLxL, который обеспечивает взаимодействие с белками-ингибиторами TPL/TPR. Этот мотив отсутствует у шести Aux/IAA картофеля: StIAA13, 16, 17, 19, 26 и 32. Особый интерес представляет домен DII. Он имеет второе название «Degron» и участвует в связывании ауксина. Было установлено, что DII должен содержать мотив QVVGWPPV/IRxxR, чтобы быть эффективным [9]. Всего таким консервативным мотивом обладают 16 репрессоров Aux/IAA картофеля: StIAA1-4, 6-8, 10-12, 14, 15, 21-23, 25. Домены PB1 включают так называемые субдомены DIII и DIV. У картофеля только у StIAA17 отсутствует консервативный лизин в DIII, а DIV имеется у всех членов семейства. В геноме Отава мы идентифицировали 39 канонических StIAA, при этом общее количество Aux/IAA генов равно 56. В картофеле DM остались не охарактеризованы еще 9 белков StIAA. Интересно, что тетраплоид Отава демонстрирует меньшее разнообразие в плане ортологов Aux/IAA, чем DM картофель. Так, в Отаве нет ортологов StIAA13,17, а ортолог StIAA19 усечен до 79 а.о.

Семейство TPL/TPR представлено в картофеле DM 6 генами. Кодированные белки довольно крупные, их длина варьирует от 1132 (StTPL) до 1180 (StTPR5c) а.о. Они содержат на N-конце TOPLESS-домен, а в остальной части белка – два WD40-домена. Филогенетически это семейство образует четыре группы, среди которых ортологи TPR5 специфичны для рода *Solanum*, так как отсутствуют у арабидопсиса и риса.

К настоящему времени накоплено много данных о неканонической ауксиновой сигнализации. Одним из давно известных кандидатов в мембранные рецепторы ауксина является небольшой белок ABP1 [10]. У картофеля DM имеется один ген *ABP1*. Присутствует один домен

Auxin<sub>BP</sub> (PF02041.19) (рис. 1). На N-конце имеется сигнальный пептид, направляющий белок в ЭР, а на С-конце – KDEL-последовательность, характерная для растворимых белков-резидентов ЭР. У сорта Отава имеется четыре гена *ABP1*. Согласно последним данным, *ABP1* действует в связи с протеинкиназами семейства ТМК, в частности ТМК1 и, возможно, также ТМК4 [5]. В картофеле DM семейства ТМК представлено 9 генами. Кодированные белки содержат на N-конце LRR-домены. За ними следует трансмембранная альфа-спираль, а на С-конце находится тирозин/серин/треониновая киназа (PF07714.20). Филогенетически картофельные ТМК делятся на три группы, представленные в DM StТМК1, 4 и 5. Удивительно, но представителей последней группы нет в арабидопсисе, хотя они присутствуют в томате и рисе. Из трех представителей первой группы StТМК1с не имеет ТМ и киназных доменов. Тетраплоид *Otava* имеет 23 гена ТМК, из которых 21 ген является функциональным.

Важной группой кандидатов на роль неканонических ауксиновых сигнальных факторов являются ортологи *AtETT/ARF3*. У картофеля DM есть два члена этого семейства, *StARF3* и *StARF4*. Эти два белка являются близкими родственниками, хотя у них есть очевидные различия. У ортологов *ARF3* структура доменов PB1 сильно изменена. Напротив, *StARF4* и *AtARF4*, очевидно, обладают функциональными PB1 доменами, что означает их участие в канонической ауксиновой сигнализации. У картофеля *Otava* мы идентифицировали 7 генов этой группы.

F-box белок *SKP2A* арабидопсиса в присутствии ауксина способствует делению клеток. У картофеля нет близкого ортолога этого гена, но есть общий ортолог генов *AtSKP2A* и *B*, названный *StSKP2A/B*. Он состоит из F-box- и LRR-доменов (рис. 1). Отсутствие прямого ортолога *SKP2A* ставит под сомнение функционирование этого сигнального механизма у картофеля.

Один из неканонических путей модуляции базовой ауксиновой сигнализации у арабидопсиса включает репрессорный белок *AtIAA33* и стабилизирующую протеинкиназу *AtMPK14*. Как выяснилось, у картофеля нет близких ортологов протеинкиназы *MPK14*. Два ближайших квази-ортологов были названы *StMPK1* и *StMPK2*. У сорта *Otava* обнаружены четыре представителя этой группы. Отсутствие подлинной гомологии между *MPK14* арабидопсиса и его ближайшими ортологами также ставит под сомнение функционирование этого механизма у картофеля. Эти сомнения еще более усиливаются при рассмотрении второго компонента этого сигнального пути, а именно ортолога белка *AtIAA33*. У картофеля, действительно, есть такой близкий ортолог, а именно *StIAA17*. Однако у сорта *Otava* ген *StIAA17* отсутствует. Филогенетический анализ *Aux/IAA* у картофеля показывает, что нет прямых ортологов и для *IAA20,30*, которые взаимодействуют в

арабидопсисе с транскрипционным фактором ARF5/MP. Зато у картофеля есть близкий ортолог группы AtIAA32,34, а именно StIAA32. И есть по крайней мере 7 функциональных ТМК (в картофеле DM), близких по структуре к таковым у арабидопсиса. Таким образом, с этой точки зрения существование альтернативной ауксиновой сигнализации IAA32 + ТМК1 у картофеля весьма вероятно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aksenova N.P., Konstantinova T.N., Golyanovskaya S.A. et al. // Russ. J. Plant Physiol. 2000. 47: 370-9.
2. Wang D., Cheng L., Wang Y., Zhang F. // Am. J. Potato Res. 2018. 95: 395-412.
3. Bargmann B.O., Estelle M. // Plant. 2014. 151: 52-61.
4. Simonini S., Deb J., Moubayidin L. et al. // Genes Dev. 2016. 30: 2286-96.
5. Kuhn A., Harbrough S.R., McLaughlin H.M. et al. // ELife. 2020. 9: e51787.
6. Friml J., Gallei M., Gelová Z. et al. // Nature. 2022. 609: 575-81.
7. Jurado S., Abraham Z., Manzano C. et al. // Plant Cell. 2010. 22: 3891-904
8. Sun H., Jiao W.B., Krause K. et al. // Nat. Gen. 2022. 54. 342-8.
9. Calderón-Villalobos L.I., Lee S., De Oliveira C. et al. // Nat. Chem. Biol. 2012. 8: 477-85.
10. Napier R. // Cold Spring Harbor Persp. Biol. 2021. 13: a039909.

## ТКАНЕВАЯ И ОРГААННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЦИТОКИНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КАРТОФЕЛЯ. ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕНСОРНЫХ ГИСТИДИНКИНАЗ

Мякушина Ю.А., Колачевская О.О., Гетман И.А., Синькевич И.А.,  
Архипов Д.В., Бравкова Е.В., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,  
Москва, Россия

**Введение.** Картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур в мире. Клубни картофеля – ценный продукт питания человека, содержащий большое количество углеводов, белков, жиров, а также минеральные соли и витамины. Важную роль в формировании клубней играют фитогормоны, в частности цитокинины. В предыдущих работах показано, что кинетин значительно стимулирует инициацию клубней, ускоряя сроки образования и увеличивая число клубней у картофеля, выращенного *in vitro* [1,2]. Ключевыми компонентами восприятия и передачи гормонального сигнала в клетке являются рецепторы. Роль рецепторов цитокининов выполняют сенсорные гистидинкиназы. Они имеют сложную мультидоменную

структуру и локализованы внутри клетки на мембранах эндоплазматического ретикулума [3]. В предыдущих исследованиях нам удалось амплифицировать и клонировать 6 генов цитокининовых рецепторов на основе генома тетраплоидного картофеля сорта Дезире: *StHK2a*, *StHK2b*, *StHK3a*, *StHK3b*, *StHK4a* и *StHK4b* [4]. Данные сенсорные гистидинкиназы относятся к трем известным группам рецепторов: НК2, НК3 и НК4. Таким образом, каждый цитокининовый рецептор картофеля сорта Дезире представлен двумя аллельными изоформами. За счет подбора адекватных праймеров нам удалось амплифицировать промоторы генов данных рецепторов и определить их нуклеотидные последовательности. Целью настоящей работы является исследование экспрессии генов цитокининовых рецепторов в различных органах и тканях картофеля.

**Материалы и методы.** Для анализа экспрессии генов цитокининовых рецепторов растения картофеля сорта Дезире выращивали *in vitro* в условиях длинного дня (16 часов) в жидкой среде Мурасиге-Скуга с содержанием сахарозы 1.5 и 5%. Через 5-6 недель органы растений (листья, стебли, корни и клубни) были собраны и зафиксированы в жидком азоте. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента Trizol [5] и использовали для синтеза кДНК. Уровень экспрессии генов цитокининовых рецепторов картофеля определяли с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. В качестве референсных использованы гены домашнего хозяйства *StEF1a* (elongation factor 1- $\alpha$ , AB061263) and *StCYC* (cyclophilin, AF126551) [6].

Для амплификации промоторов генов цитокининовых рецепторов картофеля была использована геномная ДНК, выделенная из надземной части картофеля с применением СТАВ-метода. Для создания конструкций «Промотор::GUS» были взяты промоторы генов цитокининовых рецепторов *StHK2a*, *StHK3a* и *StHK4a* вместе с 5'-нетранслируемой областью (UTR) общей длиной 2450 пн, 2422 пн и 2515 пн, соответственно. Исследуемые промоторы были объединены с репортерным геном *GUS* с помощью полимеразной цепной реакции и клонированы в плазмидные векторы рK7WG и рK7m34GW. Трансформацию растений картофеля проводили методом инокуляции листовых дисков агробактериями.

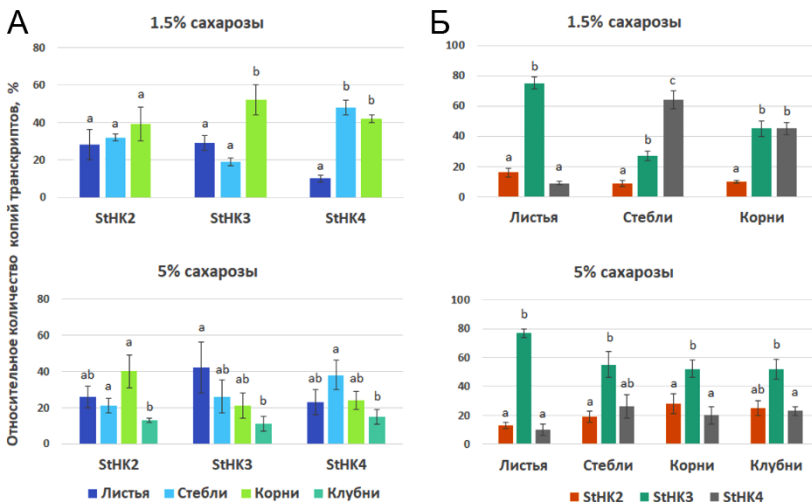
Полученные трансгенные растения картофеля выращивали *in vitro* на агаризованной среде Мурасиге-Скуга при 22°C и 16-часовом фотопериоде в течение четырех недель. Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* определяли гистохимически. Для этого органы растений (листья, стебли, корни и клубни) инкубировали в течение ночи при 37°C в растворе *X-Gluc* (5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-глюкуронид).

**Результаты и обсуждения.** Мы изучили экспрессию генов цитокининовых рецепторов в различных органах растений картофеля, выращенных *in vitro* в условиях благоприятных для вегетативного роста (1.5% сахарозы) и клубнеобразования (5% сахарозы). Содержание мРНК

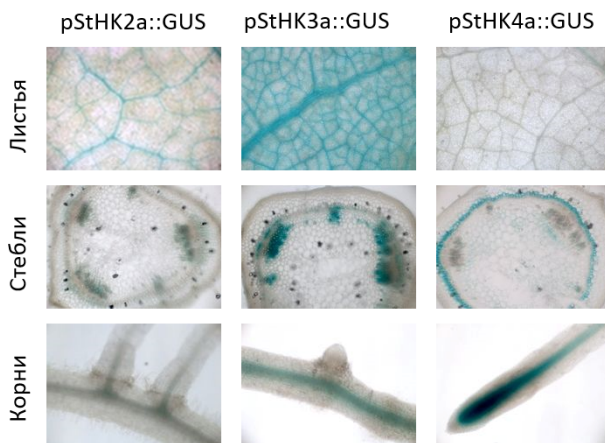
генов *StHK2*, *StHK3* и *StHK4* определяли методом количественной ПЦР в реальном времени. Для каждой группы генов цитокининовых рецепторов картофеля сорта Дезире были подобраны праймеры, комплементарные обеим изоформам. Паттерны экспрессий всех исследуемых генов значительно отличались у растений, выращенных на среде с низким (1.5%) и высоким (5%) содержанием сахарозы. Если в присутствии 1.5% сахарозы экспрессия *StHK3* превалировала в корнях, то в среде с 5% сахарозы пик активности данного гена наблюдался в листьях. В растениях, выращенных на среде с низким содержанием сахарозы ген *StHK4* был слабо экспрессирован в листьях, по сравнению со стеблями и корнями. В то же время при высоких концентрациях сахарозы количество мРНК гена *StHK4* во всех органах растений было примерно одинаковое. Заметные органоспецифические различия в экспрессии гена *StHK2* были обнаружены только у растений картофеля в присутствии высокой концентрации сахарозы в среде (5%). Самая низкая активность всех генов цитокининовых рецепторов наблюдалась в клубнях (рис. 1А).

Независимо от содержания сахарозы в среде максимальная экспрессия *StHK3* наблюдалась в листьях (рис. 1Б). При этом активность генов *StHK2* и особенно *StHK4* в листьях была намного слабее. В стеблях растений, выращенных в присутствии 1.5% сахарозы, наибольшую активность проявлял *StHK4*, а наименьший уровень экспрессии был идентифицирован у гена *StHK2*. В корнях экспрессия *StHK2* была также достаточно слабой, в то время как гены *StHK3* и *StHK4* экспрессировались очень интенсивно и почти в равной степени. У растений картофеля, выращенных в присутствии 5% сахарозы, наблюдалась стабильная апрегуляция гена *StHK3* во всех исследуемых органах (стебли, корни и клубни). Экспрессия *StHK2* также возрастала в стеблях и корнях. При этом уровень экспрессии *StHK4* в корнях снижался.

Для изучения тканевой локализации рецепторов цитокининов картофеля промоторы генов *StHK2a*, *StHK3a* и *StHK4a*, средней длиной 2500 пн, были объединены с репортерным геном *GUS*. Последовательности pStHK2a-GUS и pStHK3a-GUS были клонированы в плазмидный вектор pK7WG с помощью рестриктаз. Клонирование ПЦР-продукта pStHK4a-GUS было проведено с помощью технологии Gateway (Invitrogen) в плазмидный вектор pK7m34GW. В результате агробактериальной трансформации растений картофеля для каждого промотора были получены 10 независимых трансформантов, устойчивых к селективному агенту. Для дальнейшего исследования трансгенные растения выращивались в течение 4 недель на агаризованной среде Мурасиге-Скуга с содержанием сахарозы 2% [7,8]. Активность репортерного гена *GUS* определяли методом гистохимического окрашивания органов картофеля (корни, стебли, листья) в растворе X-Gluc.



**Рис. 1.** Экспрессия генов цитокининовых рецепторов в растениях картофеля сорта Дезире, выращенных в жидкой среде Мурасиге-Скуга с содержанием сахарозы 1.5 и 5%. (А) Распределение экспрессии генов по органам картофеля. (Б) Распределение экспрессии генов по группам рецепторов. Относительное количество копий транскриптов представлено как процентное содержание от общего количества транскриптов в каждой группе столбцов, принятого за 100%. Буквы (a, b, c) обозначают статистические достоверные различия ( $P < 0.05$ ).



**Рис. 2.** Результаты GUS-окрашивания трансгенных растений картофеля.

Данные гистохимического окрашивания подтверждают результаты количественного ПЦР в реальном времени. Репортерный ген *GUS* под контролем промотора pStНК2а достаточно слабо экспрессируется во всех органах картофеля. Промоторы pStНК3а и pStНК4а проявляют большую активность. Под их действием количество мРНК гена *GUS* значительно увеличивается в стеблях и корнях. В листьях наблюдается максимальная активность pStНК3а и, как ожидалось, минимальная активность pStНК4а (рис. 2).

Экспрессия репортерного гена *GUS* под управлением промоторов pStНК2а и pStНК3а была идентифицирована в проводящих сосудах листьев, проводящих тканях стебля (ксилеме) и корнях. Активность гена *GUS* под действием промотора pStНК4а была обнаружена в проводящих тканях стебля (флоэме) и корнях.

**Заключение.** В результате исследования нам удалось детально охарактеризовать органную и тканевую специфичность транскрипции генов цитокининовых рецепторов в растениях картофеля. Было установлено, что экспрессия генов этих сенсорных гистидинкиназ в значительной степени зависит от условий выращивания картофеля, в частности от концентрации сахарозы в питательной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 23-24-00540; проект № 22-14-00259).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Romanov G.A., Aksenova N.P., Konstantinova T.N. et al. // Plant Growth Reg. 2000. 32: 245-51.
2. Aksenova N.P., Sergeeva L.I., Kolachevskaya O.O., Romanov G.A. // Bulbous Plants: Biotechnology. CRC Press. N.-Y. 2014. 3-36.
3. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. // J. Exp. Botany. 2011. 62: 5149-59.
4. Lomin S.N., Myakushina Yu. A., Kolachevskaya O.O. et al. // J. Exp. Botany. 2018. 69: 3839-53.
5. Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I. et al. // Plant J. 2005. 44: 314-33.
6. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Botany. 2005. 56: 2907-14.
7. Kolachevskaya O.O., Alekseeva V.V., Sergeeva L.I. et al. // J. Integ. Plant Biol. 2015. 57: 734-44.
8. Kolachevskaya O.O., Sergeeva L.I., Flokov K. et al. // Plant Cell Rep. 2017. 36: 419-35.



# ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ – СЕНСОРА НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ (БИОМЕДИАТОРОВ)

Рощина В.В.<sup>1</sup>, Яшин В.А.<sup>1</sup>, Куньев А.Р.<sup>1</sup>, Фатерыга В.В.<sup>2</sup>,  
Солтани Г.А.<sup>3</sup>, Призова Н.К.<sup>1</sup>, Хайбулаева Л.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки, ФБГУН Пущинский биологический центр  
РАН, Пущино, Россия

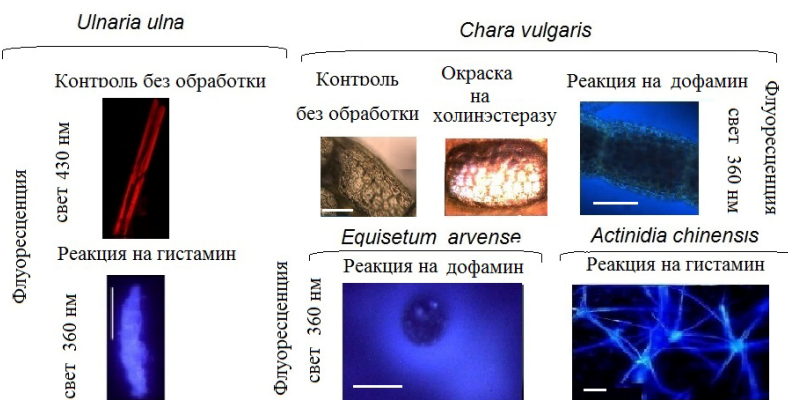
<sup>2</sup>Карадагская биологическая станция им. Т.И. Вяземского, Карадагский  
госзаповедник, Институт южных морей РАН, Феодосия, Крым, Россия

<sup>3</sup>Дендрарий ФГБУ «Сочинский национальный парк» Министерства  
природных ресурсов РФ, Сочи, Россия

**Введение.** Еще до появления нервной системы животных ацетилхолин и биогенные амины, соединения, теперь известные как нейротрансмиттеры, присутствовали в растительных и микробных клетках. Их функции, возможно, менялись в ходе эволюции [1]. Присутствие ацетилхолина и биогенных аминов катехоламинов, серотонина, гистамина было обнаружено на поверхности и в выделениях растительной клетки, внутри нее и в изолированных органеллах [1,2]. Развиваются представления о существовании общих сигнальных механизмов во всех живых организмах с участием этих соединений [3]. Целью данной публикации является оценка возможностей дальнейших исследований, рассмотрение новых проблем и подходов.

**Присутствие нейротрансмиттеров внутри клетки и на поверхности.** Известно, что эти соединения служат сигналами во внутриклеточных и межклеточных контактах, регулируют реакции роста и развития. На рис.1 приведены примеры обнаружения биогенных аминов и фермента холинэстеразы как маркера присутствия ацетилхолина у организмов, стоящих на самой низкой ступени развития растений – одноклеточных диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compere из сем. Bacillariophyta, многоклеточных харовых водорослей *Chara vulgaris* L. (сем. Characeae), одноклеточных вегетативных микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* L. (сем. Equisetaceae) и покрытосеменного растения *Actinidia chinensis* Planch. (сем. Actinidaceae). Гистохимический анализ с реагентами на холинэстеразу (Fast Red TR salt дает красное окрашивание в реакции с β-нафтилацетатом). Дофамин и гистамин (реакции с соответственно с глиоксиловой кислотой и о-фталевым альдегидом) обнаруживает флуоресценция в голубой области спектра 460-470 нм (табл. 1). Этими методами показана локализация нейротрансмиттеров в клетке. Они встречаются в выделениях с поверхности клеток, в секретах и секреторных клетках, а также могут быть внутри клеток, именно в органеллах – хлоропластах, ядрах и вакуолях [2]. Есть данные о

нахождении биогенных органах размножения - вегетативных спорах хвоща и папоротника. В табл. 1 приведены примеры гистохимического анализа этих соединений для клеток и секретов диатомеи *Ulnaria* и папоротника *Asplenium*.



**Рис. 1.** Реакции на холинэстеразу как маркера ацетилхолина и биогенные амины в растениях, находящихся на различных этапах эволюции. Масштаб для *Ulnaria* и *Chara* 100 мкм, для *Equisetum* и *Actinidia* – 30 мкм.

**Табл. 1.** Биогенные амины у диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* L. и вегетативных спорах папоротника листовика обыкновенного *Asplenium scolopendrium* L.

Вид растения	Флуоресценция при 460 нм, условных единиц			
	Контроль, аутофлуоресценция	после гистохимических реакций на		
		дофамин	гистамин	серотонин
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compere	10.3 ± 0.1	60.7 ± 0.2	34.0 ± 7.0	14.4 ± 0.2
<i>Asplenium scolopendrium</i> L. спора	15.5 ± 0.2	39.2 ± 0.9	102.8 ± 4.0	32.6 ± 2
секрет	0	57.4 ± 6.0	71 ± 5	14.4 ± 2

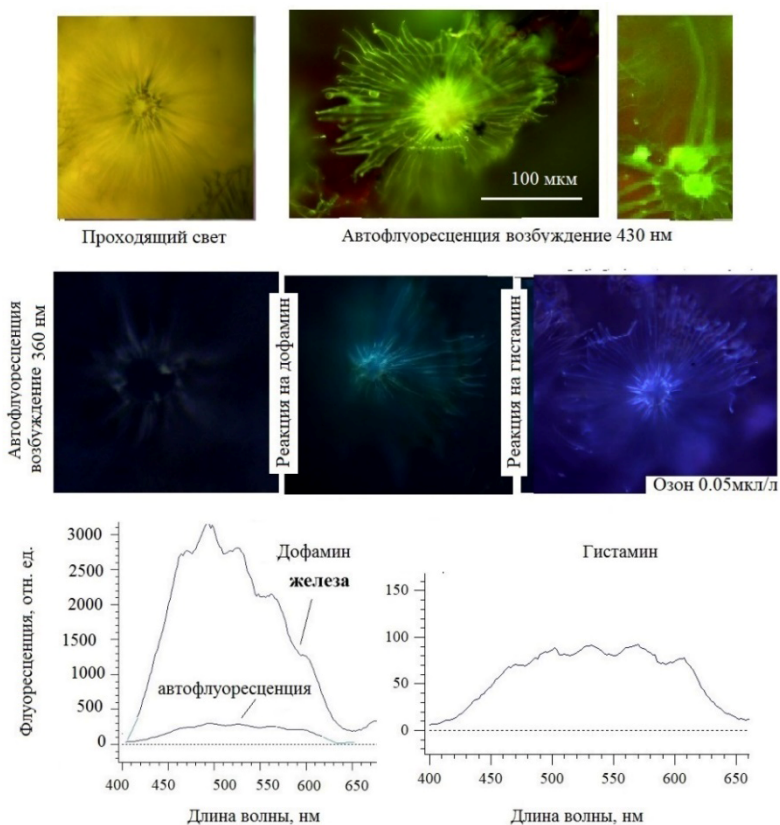
Экзогенные биогенные амины оказывают влияние на рост и развитие не только высокоорганизованных многоклеточных растительных организмов, но и одноклеточных, и тем самым играют значительную роль в жизни растений. Соединения, такие как дофамин и гистамин, могут быть у некоторых видов при норме, но часто появляются при стрессе. Они накапливаются под воздействием различных стрессовых факторов, как абиотических, так и биотических при биоценозе. Растения подвергаются

ультрафиолетовому облучению, озону, засолению, засухе, дефициту питательных веществ и так далее. Во многих случаях появление биогенных аминов является реакцией на факторы окружающей среды. Наиболее изученными являются экзогенные эффекты дофамина на растения, подвергшиеся абиотическому повреждению факторами, влияющими на физиологическое состояние целых растительных организмов [2,3]. Также есть первые данные, связанные с ролью гистамина [2]. Биотические факторы, такие как биоценотические взаимодействия между различными живыми организмами (растениями, животными, микробами), также могут играть роль в появлении стресса, где участвуют биогенные амины и ацетилхолин [2].

В таблице 2 показано влияние экзогенных нейротрансмиттеров и их антагонистов на развитие диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* L. Заметное увеличение числа клеток наблюдали в вариантах с гистамином и серотонином в концентрациях  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, тогда как у ацетилхолина при концентрации  $10^{-4}$  М. Все использованные антагонисты d-тубокурарин, мускарин (блокаторы рецепторов ацетилхолина), иохимбин (блокатор дофаминовых рецепторов), тавегид (блокатор гистаминовых рецепторов) и инмекарб (блокатор серотониновых рецепторов) в разной степени снижали количество клеток. На их фоне добавление нейротрансмиттеров не приводило к увеличению количества клеток в образцах. Таким образом, самые примитивные одноклеточные организмы проявляют заметную чувствительность к нейротрансмиттерам и их антагонистам, что указывает на возможный механизм рецепции, сходный с тем, что наблюдается у млекопитающих.

**Табл. 2.** Влияние экзогенных нейротрансмиттеров и их антагонистов на рост и развитие у диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* L. (Число флуоресцирующих красным светом клеток в 10 полях зрения люминесцентного микроскопа). Без добавок  $63 \pm 6$  клеток

Вещество	$10^{-6}$ М	$10^{-5}$ М	$10^{-4}$ М
Ацетилхолин	$58 \pm 6$	$40 \pm 7$	$103 \pm 8$
Дофамин	$24 \pm 2$	$22 \pm 1$	$2.3 \pm 0.1$
Гистамин	$124 \pm 8$	$88 \pm 7$	$67 \pm 2$
Серотонин	$90 \pm 6$	$52 \pm 5$	$9 \pm 1$
d-Тубокурарин	$56 \pm 7$	$54 \pm 6$ желтые клетки	$46 \pm 6$
Мускарин	$13 \pm 3$	0	0
Иохимбин	$14 \pm 2$	$38 \pm 5$	$17 \pm 6$
Тавегил	$10 \pm 3$	$8 \pm 2$	0
Инмекарб	$3 \pm 1$	$5 \pm 1$	$12 \pm 2$



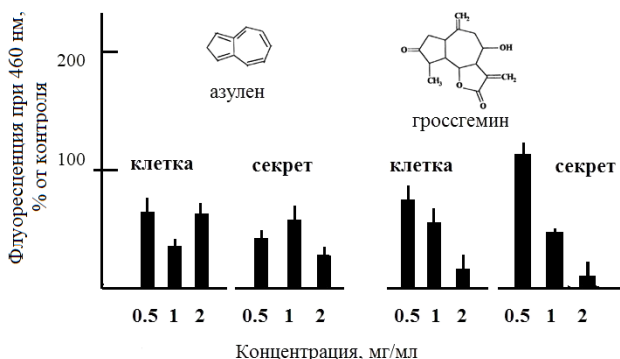
**Рис. 2.** Гистохимические реакции на дофамин и гистамин в секреторной чешуйке-железе листьев облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. Вверху – вид железы под люминесцентным микроскопом в проходящем свете и при возбуждении светом 360-380 нм. Внизу – спектры флуоресценции при возбуждении 360 нм.

**Поверхность клеток как сенсор нейротрансмиттеров и антинейротрансмиттерный фильтр.** Поверхность растений чувствительна к изменениям концентрации тропосферного озона, засолению, травмирующим факторам [4]. Воспринимают внешние сигналы в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы. Сенсорами нейротрансмиттеров могут являться и специализированные секреторные клетки поверхности (железы, волоски и др.), поскольку содержат, ферменты, регулирующие их содержание, а также антинейротрансмиттеры, вещества, уменьшающие токсическое действие нейротрансмиттеров или блокирующие рецепторы. Биогенные амины часто встречаются при стрессе. Например, как это показано в секреторных

клетках облепихи (рис. 2). Было установлено заметное повреждение таких клеток в кратковременном остром опыте и при хроническом воздействии озоном [4]. Роль сенсора в этом случае выполняют компоненты клеточной стенки, действующие как антиоксиданты и возможные антинейротрансмиттеры функции антиоксидантов фенольные соединения и азулены [4]. С присутствием азуленов связан голубой цвет поверхностей, который может принадлежать этим пигментам у некоторых травянистых и древесных растений. Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных. У поверхностных клеток листьев с голубой или серебристой окраской у устойчивых к озону видов (табл. 3) слои кутикулы и клеточной стенки этих растений содержали азулены. В спектрах поглощения листьев отмечены характерные для этих синих пигментов максимумы соответственно 580-585 нм и 608-610 нм, а в спектрах флуоресценции – 410 нм или 430 нм. В этом случае синие пигменты служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием.

**Табл. 3.** Содержание азуленов на поверхности листьев растений (10 мин экстракты этанолом, максимум 608-610 нм)

Вид растения	Азулены, мг/г сырой массы
<i>Hippophae rhamnoides</i> L. Облепиха крушиновидная (Elaeagnaceae) листья	1.0 ± 0.1
Райграс пастбищный <i>Lolium perenne</i> L. (Graminae) листья	1.63 ± 0.1
Можжевельник высокий <i>Juniperus excelsa</i> M.Bieb (Cupressaceae) листья/ плоды	1.76/1.46 ± 0.3/0.01
Можжевельник средний <i>Juniperus x media</i> M.Bieb (Cupressaceae) листья/ плоды	0.55/2.96/ ± 0.01/0.3
Хвощ полевой <i>Equisetum arvense</i> L. вегетативные споры	1.7 ± 0.2



**Рис. 3.** Эффекты сесквитерпенов на содержание дофамина в клетках вегетативных микроспор хвоща *Equisetum arvense* в условиях засоления.

В модельных опытах на вегетативных микроспорах хвоща продемонстрированы антигистаминные свойства экзогенных азулена и проазуленовых сесквитерпенов [5]. На рис. 3 показано, что в таких же условиях обнаружено их влияние и на содержание дофамина в клетках и выделяющемся секрете в условиях засоления среды 0.1% сульфатом натрия, стимулирующего выход биогенных аминов наружу. Наибольший эффект снижения дофамина отмечен для гроссгемина и азулена, как в клетках, так и секрете (рис. 3).

Заключение. Соединения, известные как нейротрансмиттеры, обнаружены уже на одноклеточных растительных организмах, где выполняют сигнальную и регуляторную функции. На разных этапах эволюции растительных клеток их поверхность выполняет роль сенсора экзогенных нейротрансмиттеров и регулятора концентрации таких соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Roshchina V.V.* // Adv. Exp. Med. Biology. 2016. 874: 2527.
2. *Ramakrishna A., Roshchina V.V.* // Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications. CRC Press, Boca Raton. 2019. P. 147-80.
3. *Roshchina V.V., Yashin V.A., Podunay Yu.A.* // Austin Envir. Sci. 2022. 7: 107-10.
4. *Поцина В.В., Кучин А.В., Куньев А. и др.* // Биол. Мембр. 2022. 39 (1): 54-62.
5. *Roshchina V.V., Kononov D.A.* // Future Pharmacol. 2022; 2(2): 126-34

## ПРОИЗВОДНЫЕ N6-БЕНЗИЛАДЕНИНА С АНТИЦИТОКИНИНОВЫМ ДЕЙСТВИЕМ СТИМУЛИРУЮТ РОСТ КОРНЕЙ У ПРОРОСТКОВ АРАБИДОПСИСА

*Савельева Е.М.<sup>1</sup>, Ословский Е.М.<sup>2</sup>, Романов Г.А.<sup>1</sup>*

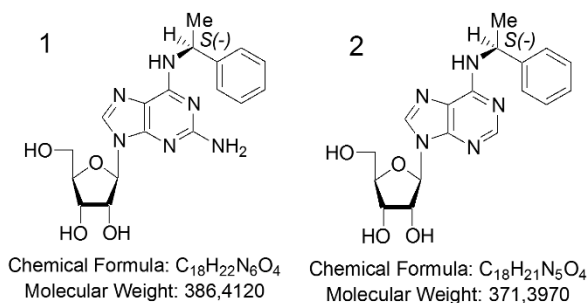
<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
Москва, Россия

**Введение.** Цитокинины – это группа классических фитогормонов, образующих одну из важнейших растительных регуляторных систем [1]. Возможность управления этой системой может открыть для сельского хозяйства широкие перспективы по эффективному воздействию на рост и продуктивность растений. Главной задачей на пути к достижению этой цели является устранение негативного влияния цитокининов на корнеобразование при сохранении их многообразных позитивных эффектов (стимуляция роста надземной части растения, адаптация к стрессовым факторам и др.).

Физиологические реакции, вызываемые цитокининами, происходят в растении через регуляцию экспрессии определенных генов. Трансдукция сигнала до целевых генов происходит с помощью двухкомпонентной системы, где ключевую роль играют цитокининовые рецепторы [2]. Эти рецепторы существуют в растении в нескольких изоформах, локализующихся преимущественно в разных органах и тканях и имеющих различия в лигандной специфичности [3]. Совокупность этих факторов создаёт потенциальную возможность точечного регулирования цитокининового сигналинга за счёт создания рецептор-специфичных цитокининов и/или антицитокининов. Такие соединения позволяют усилить цитокининовый сигналинг в тех органах и тканях растения, где цитокинины положительно влияют на рост и развитие и ослабить там, где их действие негативно.

Ранее в ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* мы обнаружили два новых соединения, производных цитокинина N6-бензиладенина (БА), обладающих рецептор-специфичным антицитокининовым эффектом (рис. 1) [4]. В данном исследовании мы, уже на интактных растениях, продолжили изучение действия этих веществ, в частности – их влияние на корнеобразование.



**Рис. 1.** Структурные формулы исследуемых потенциальных антицитокининов, производных БА.

**Материалы и методы.** Для исследования эффектов, оказываемых соединениями **1** (специфично к рецептору АНК4) и **2** (специфично к рецепторам АНК2 и АНК4) на растения, мы использовали проростки арабидопсиса, трансформированные геном *GUS* под контролем цитокинин-зависимого промотора PARR5.

В первой серии экспериментов семена арабидопсиса стерилизовали 15 мин в 3%-м растворе перекиси водорода, 15 мин в 70%-м растворе этанола, и 30 мин в растворе гипохлорита натрия (коммерческое средство «Белизна»), затем в стерильных условиях ламинар-бокса промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой. Чашки

с семенами стратифицировали в течение суток в холодильной камере (4°C), после чего проращивали 5-6 дней при 22-23°C и световом дне 16 часов. Затем проростки переносили на агаризованную среду MS (1/2 по макросолям) на вертикальные чашки и выращивали в течение недели. В среду были добавлены исследуемые соединения в концентрациях 1 или 10 мкМ, а также N6-бензиладенин рибозид (БАР) в таких же концентрациях в качестве положительного контроля. Среда без добавок служила отрицательным контролем. Через неделю у растений измеряли длину главного корня и подсчитывали количество боковых корней. Аналитическая повторность – 20, биологическая – 3.

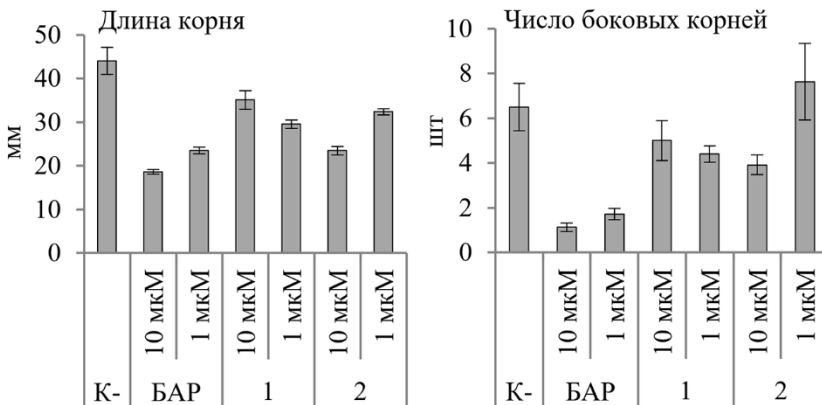
Во второй серии опытов семена стерилизовали аналогичным образом и помещали в воду (отрицательный контроль), 10 мкМ растворы исследуемых соединений или БАР той же концентрации (положительный контроль). После стратификации и проращивания часть растений переносили на вертикальные чашки с агаризованной средой 1/2MS без добавок (аналитическая повторность – 20, биологическая – 2), а у второй части сразу измеряли длину корешков (аналитическая повторность – 100, биологическая – 2). Для этого их фотографировали с помощью фотокамеры и микроскопа AxioImager D1 (Carl Zeiss), фотографии анализировали в программе ZEN (blue edition).

В тех пробах, где производили измерение длины корней, у растений также проверяли уровень цитокининовой активности. Её определяли по уровню GUS-активности, отражающему интенсивность экспрессии встроенной в геном конструкции *P<sub>ARR5</sub>:GUS* [5]. Аналитическая повторность – 3, биологическая – 2.

**Результаты и обсуждение.** Соединения **1** и **2** были выбраны для исследований в том числе из-за того, что они, по-видимому, ингибируют действие цитокининов на «корневой» рецептор АНК4. Таким образом, мы ожидали, что их применение позволит увеличить среднюю длину главного корня растений по сравнению с контролем «на воде». Однако, первая серия экспериментов показала, что добавление в питательную среду исследуемых соединений в описанных условиях (см. материалы и методы) приводит к уменьшению длин корней и количества боковых корней по сравнению со средой без добавок (рис. 2).

Ингибирование роста корня – эффект, типичный для цитокининов [6]. При этом рибозиды являются транспортной, а не активной формой цитокининов [7]. Таким образом, замедление роста корней при внесении рибозидов в питательную среду может происходить в случае ферментативного расщепления этих веществ на адениновое основание и рибозу. При этом нами ранее было показано, что основания соединений **1** и **2** являются цитокининами [4]. Можно предположить, что к двухнедельному возрасту на проростки арабидопсиса оказывает влияние уже не рибонуклеозиды с антицитокининовым действием, а цитокининовые основания.

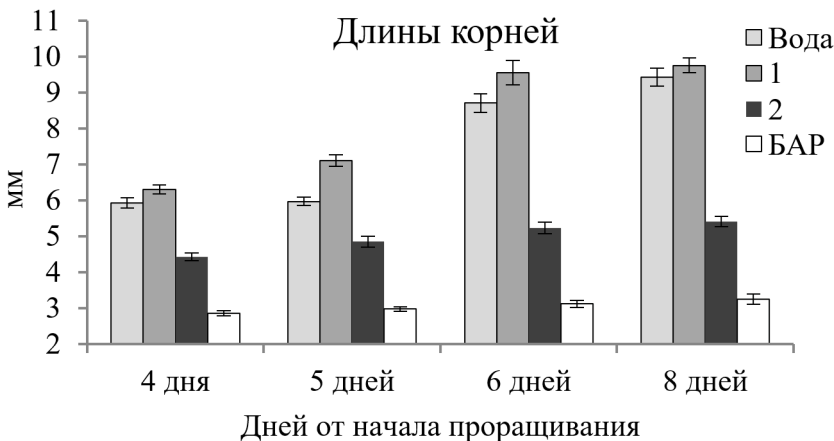




**Рис. 2.** Длины главных корней и количество боковых корней растений арабидопсиса в условиях проращивания их на воде (1-я неделя) и на питательной среде с добавлением БАР или его производных (2-я неделя).

Тем не менее, интересные результаты продемонстрировало соединение 1: увеличение его концентрации до 10 мкМ привело к достоверному увеличению длины корней по сравнению с концентрацией 1 мкМ.

Иная картина наблюдается, если семена с первого дня проращивать не на воде, а на растворах исследуемых соединений (рис. 3). В этой серии экспериментов мы использовали только концентрацию 10 мкМ.

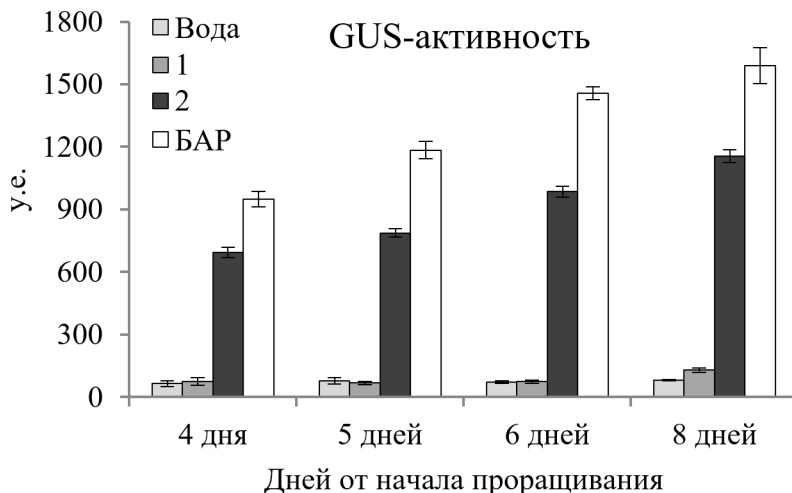


**Рис. 3.** Длины корней растений арабидопсиса при проращивании на растворах исследуемых соединений и БАР (K<sup>+</sup>), 10 мкМ.

Во второй серии опытов у растений, проращиваемых на растворе соединения **1**, с 4 по 6 день корни были в среднем длиннее, чем у растений на воде. К 8-му дню достоверная разница исчезала. Соединение **2**, как и БАР (K<sup>+</sup>), по-прежнему ингибировало рост корней.

По всей видимости, ферменты, вовлечённые в процесс превращения цитокининовых рибозидов в основания, имеют различное средство к исследуемым соединениям. Можно предположить, что соединение **2** (и более того, природный рибозид БАР) легче превращаются в цитокинины и, таким образом, для этого требуется меньшее количество ферментов. А для отщепления рибозы от значительного числа молекул соединения **1** требуется большее количество ферментов, которые успевают накопиться только с увеличением возраста и размера растения. На это косвенно указывает и рост средней длины корня при увеличении в 10 раз концентрации вещества **1** в первом опыте.

Выдвинутые предположения подтверждаются результатами измерения GUS-активности проростков (рис. 4).



**Рис. 4.** GUS-активность растений арабидопсиса при проращивании на растворах исследуемых соединений и БАР (K<sup>+</sup>), 10 мкМ.

По-видимому, рибозид **2** и БАР действительно успевают превратиться в свои основания уже, как минимум, в 4-хдневных проростках арабидопсиса. А достоверная разница в GUS-активности между водой и раствором **1** появляется только на 8 день.

Если 4-6 дневные проростки, выращенные на растворе **1** перенести на среду MS без добавок, то через неделю средняя длина главного корня будет по-прежнему достоверно выше, чем у растений, пророщенных на воде (данные не приводятся).

Таким образом, мы подтвердили антицитокининовое действие и возможность успешного применения на интактных растениях одного рецептор-специфичного производного БА.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-74-00071.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Oshchepkov M.S., Kalistratova A.V., Savelieva E.M. et al.* // Russ. Chem. Rev. 2020. 89(8): 787-810
2. *Kakimoto T.* // Annual Review of Plant Biology. 2003. 54: 605-27.
3. *Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю.* // Acta Naturae. 2012. 4: 34-48.
4. *Savelieva E.M., Zenchenko A.A., Drenichev M.S.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. 23(19): 11334.
5. *Зверева С.Д., Романов Г.А.* // Физиология растений. 2000. 47: 479-88.
6. *Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J.* // Plant Cell. 2015. 27: 44.
7. *Romanov G.A., Schmulling T.* // Planta. 2022. 25: 1-6.

\*\*\*

## ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИЗАЦИИ В СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

### ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА CRABP1 СВЯЗАНА С УРОВНЕМ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Еникеев А.Д., Комельков А.В., Беляева А.А.,  
Галецкий С.А., Чевкина Е.М.*

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина НИИ канцерогенеза, Москва, Россия

**Введение.** Ретиновая кислота (РК) является внутриклеточным метаболитом ретинола (витамина А). Одним из наиболее активных изомеров РК является полностью транс-ретиновая кислота (all-trans retinoic acid – АТРА). АТРА успешно используется в терапии острого промиелоцитарного лейкоза [1-3]. Помимо этого, предпринимаются попытки применения АТРА и других ретиноидов для лечения солидных опухолей [4-8]. Однако использование данных терапевтических агентов ограничивается тем, что клетки солидных опухолей быстро приобретают устойчивость к ретиноидам [9-10]. Механизм РК-резистентности остается не до конца понятным. Активность РК реализуется путем ее взаимодействия с ядерными рецепторами RARs (Retinoic acid receptors) [11]. РК транспортируется в ядро с помощью белков семейства iBPs – CRABP1, CRABP2, FABP5 [12-13]. При этом показано, что CRABP1 способен связывать РК с наибольшей афинностью [14]. Предполагается, что CRABP1 секвестрирует РК в цитоплазме, предохраняя клетку от ее избытка [15-16]. В аспекте канцерогенеза CRABP1 принято считать опухолевым промотором. Так, CRABP1 обнаруживается в клетках рака поджелудочной железы, при этом в нормальной ткани он отсутствует [17]. Экспрессия CRABP1 является фактором неблагоприятного прогноза при новообразованиях головного мозга, рака легкого [18], рака молочной железы [19]. Однако существуют многочисленные данные об опухоле- супрессорной роли данного белка. Так, снижение экспрессии CRABP1 характерно для папиллярной карциномы щитовидной железы человека [20]. Гиперэкспрессия CRABP1 замедляет пролиферацию и снижает способность к колониеобразованию клеток рака пищевода [21]. Также показано, что во многих опухолях CRABP1 метилирован [21-23]. Роль данного белка в РК-резистентности ранее почти не исследовалась. Имеются данные о том, что гиперэкспрессия CRABP1 приводит к повышению резистентности РК-чувствительных клеток рака шейки матки

[24] и рака почки [25]. Исследований возможной связи экспрессии CRABP1 с ПК-чувствительностью/резистентностью клеток злокачественных опухолей различного происхождения ранее не проводилось.

**Цель.** Целью работы было сравнение экспрессии белка CRABP1 в клетках опухолей различной нозологии с разным уровнем ПК-чувствительности/резистентности.

**Материалы и методы.** *1. Клеточные линии и условия культивирования.* В качестве экспериментальных моделей использовались следующие клеточные линии: SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32 – нейробластома; H460, A549, H1299 – немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ); LN229, U87 – глиобластома; OVCAR3, OVCAR4, A1847, SK-OV-3, EFO-21 – рака яичника (РЯ); MCF7, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100 – рак молочной железы (РМЖ). Все клеточные линии культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при +37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для культивирования использовали среду RPMI или DMEM (в зависимости от клеточной линии), содержащую 0.294 мг/мл L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories), 0.1 мг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина.

*2. Анализ динамики роста клеток.* Для оценки влияния ПК на активность пролиферации высчитывали разницу между количеством живых клеток в «нулевой» точке и по прошествии 120 часов инкубации с ATRA (Sigma-Aldrich), растворенной в диметилсульфоксиде (ДМСО) в указанной концентрации. Клетки высаживали в 30-мм культуральные чашки в количестве 25-300 тыс. в зависимости от клеточной линии, через 120 часов проводили прямой подсчет в камере Горяева. Эксперименты выполнены в 3-х технических (трипликаты) и в 3-х биологических повторях. В качестве контроля клетки каждой линии инкубировали в среде с добавлением ДМСО в количестве, соответствующем максимальной концентрации ATRA.

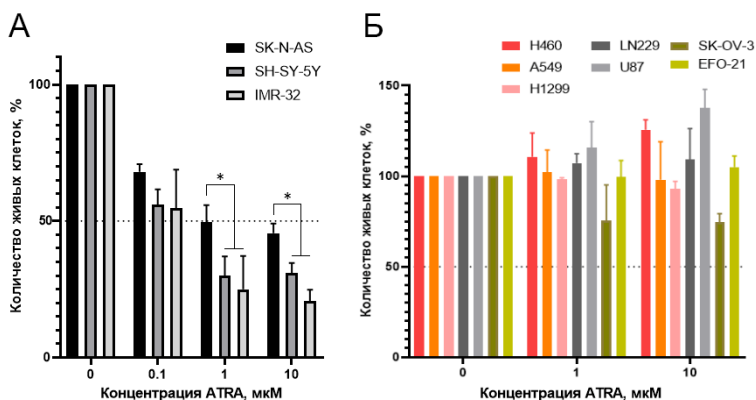
*3. Иммуноблоттинг.* Белковые лизаты получали из клеток в состоянии субконфлуентного монослоя. Иммуноблоттинг проводили по описанной ранее методике [26]. Клетки лизировали в буфере RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% DoX, 1% NP-40, 0.1% SDS, 2 mM ЭДТА) с добавлением смеси ингибиторов протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Концентрацию белка определяли с помощью набора Bradford Assay Kit (Bio-Rad). Белок в количестве 15 мкг разделяли в 15% полиакриламидном геле, переносили на PVDF мембрану (Millipore). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе 5% BSA (PAA Laboratories GmbH) в буфере TBS, содержащем 0.1% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами к CRABP1 (Sigma-Aldrich, HPA17203; 1:1000) 12 часов при +4°C.

В качестве контроля использовали антитела к  $\beta$ -актину (Abcam, ab8227; 1:5000). После стандартной отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Cell Signaling Technology, 29902; 1:65000) 1 час при комнатной температуре. После отмывки мембрану проявляли с помощью реагента ECL (Enhanced Chemiluminescence, Millipore). Хемиллюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

**4. Статистическая обработка результатов.** Для статистического анализа полученных данных использовалась программа GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc). Оценку различий количества клеток между клеточными линиями или группами линий проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с тестом Даннета. Статистически значимыми различия скорости роста исследуемых клеток по сравнению с контрольной линией считались при значении параметра  $p < 0.05$  (значения приведены в тексте).

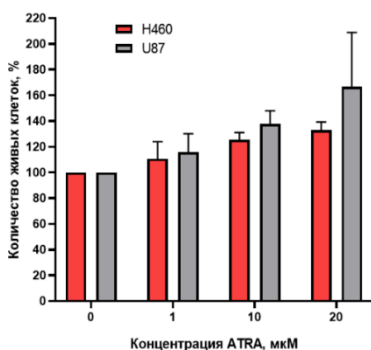
**Результаты.** Клетки злокачественных опухолей различных нозологий принято в целом рассматривать как РК-чувствительные и РК-резистентные, однако диапазон РК-чувствительности/резистентности является достаточно широким. Например, к нозологиям, которые очень чувствительны к действию РК, относятся нейробластомы, а клетки глиобластомы могут быть примером высокорезистентных типов опухолей. В то же время большинство опухолей других нозологий являются в той или иной степени РК-резистентными, но степень чувствительности/резистентности сильно варьирует. Учитывая, что литературные данные по РК-чувствительности тех или иных клеток получены в разных работах с использованием различных экспериментальных подходов, мы провели сравнение РК-чувствительности в одних и тех же условиях клеток опухолей нейробластом (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32), глиобластом (LN229, U87), а также НМРЛ (H460, A549, H1299) и рака яичника (SK-OV-3, EFO-21).

Количество живых клеток всех трех линий нейробластомы начинало снижаться уже при концентрации 0.1 мкМ АТРА, а снижение количества клеток до 50% (в два раза) и более наблюдалось при 1 и 10 мкМ (рис. 1А). Таким образом, все линии оказались РК-чувствительными, что подтверждает литературные данные. При этом клетки SK-N-AS оказались достоверно менее чувствительны к АТРА ( $p < 0.05$ ) по сравнению с линиями SH-SY-5Y и IMR-32. Анализ РК-чувствительности клеток НМРЛ, глиобластомы и РЯ показал отсутствие снижения динамики пролиферации при инкубации с АТРА в концентрациях близких к физиологическим значениям (1 мкМ и 10 мкМ), (рис. 1Б).



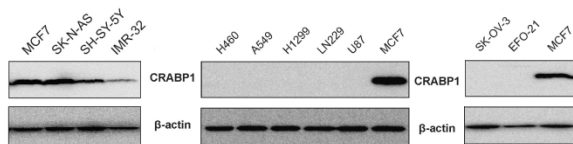
**Рис. 1.** Сравнение динамики пролиферации клеток различного происхождения при инкубации с ATRA. Указан процент живых клеток после 120 часов культивирования в присутствии ATRA в различных концентрациях по сравнению с контролем. А – Клетки нейробластомы демонстрировали снижение пролиферации (падение  $\geq 50\%$  по сравнению с контролем) при концентрации ATRA 1 и 10 мкМ. Б – Количество клеток НМРЛ, глиобластом и рака яичника не снижалось при добавлении 1 и 10 мкМ ATRA.

Повышение концентрации ATRA до 20 мкМ и выше также не приводило к изменению динамики роста (данные не приводятся). Более того, некоторые линии (H460 и U87) при 20 мкМ ATRA демонстрировали даже некоторое увеличение количества живых клеток (рис. 2). Таким образом, клетки данных нозологий можно охарактеризовать как РК-резистентные.



**Рис. 2.** Сравнение динамики пролиферации клеток H460 (НМРЛ) и U87 (глиобластома) при инкубации с ATRA в концентрации 1-20 мкМ.

Анализ экспрессии CRABP1 показал высокий уровень белка во всех трех линиях нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32). Во всех РК-резистентных клетках НМРЛ, глиобластомы и РЯ экспрессия CRABP1 отсутствовала (рис. 3). В качестве позитивного контроля использованы клетки MCF7, относящиеся к РК-чувствительным линиям РМЖ, данные анализа которых опубликованы нами ранее [27].



**Рис. 3.** Сравнение экспрессии белка CRABP1 в линиях опухолевых клеток различного происхождения. Адаптировано из [27].

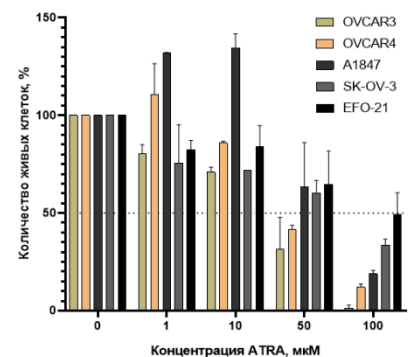
Важно отметить, что при исследовании эффекта АТРА на клетки РМЖ мы обнаружили, что линии клеток данной нозологии делятся на РК-чувствительные (50% снижения при концентрации 1-10 мкМ) и РК-резистентные, однако в пределах каждой группы спектр ответа на РК также варьирует. Так, в группе РК-чувствительных были клетки, пролиферация которых достоверно снижалась ( $p < 0.05$ ) при 0.1 мкМ АТРА, и те, которые реагировали только на 1 мкМ и 10 мкМ АТРА. В свою очередь, в группе РК-резистентных были линии, чувствительные к высоким концентрациям АТРА (пролиферация снижалась при 50 мкМ, т.е. «средне РК-резистентные») и «максимально РК-резистентные» (достоверное уменьшение количества живых клеток наблюдалось только при 100 мкМ АТРА и выше) [27].

В этой связи мы предположили, что клетки «РК-резистентных» типов опухолей, таких как НМРЛ и РЯ, также могут различаться по степени РК-чувствительности/резистентности. Для этого провели сравнительный анализ клеточных линий РЯ OVCAR3, OVCAR4, A1847, SK-OV-3 и EFO-21.

Инкубация клеток с АТРА в различных концентрациях (1, 10, 50 и 100 мкМ) подтвердила, что все исследованные РЯ в целом характеризуются РК-резистентностью – количество живых клеток при 1 и 10 мкМ АТРА не снижалось до 50%. Однако степень РК-резистентности действительно оказалась разной. Так, для линий OVCAR3 и OVCAR4 мы обнаружили значимое снижение количества живых клеток (ниже 50%, ( $p < 0.05$ )) при инкубации с 50 мкМ и 100 мкМ АТРА (рис. 4). В то же время клетки A1847, SK-OV-3 и EFO-21 оказались устойчивы к действию 50 мкМ и даже 100 мкМ АТРА (клетки EFO-21). Также интересно, что при обработке A1847 малыми дозами АТРА (1 и 10 мкМ) наблюдалось даже увеличение количества живых клеток – эффект аналогичный тому, который мы наблюдали для клеток H460 (НМРЛ) и U87 (глиобластома).

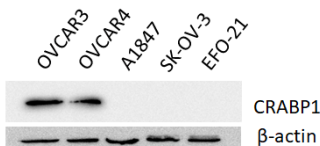


Таким образом, так же, как и клетки РМЖ, линии РЯ можно условно разделить на «средне РК-резистентные» (OVCAR3 и OVCAR4) и «максимально РК-резистентные» (A1847, SK-OV-3, EFO-21).



**Рис. 4.** Сравнение динамики пролиферации клеток рака яичника при инкубации с ATRA

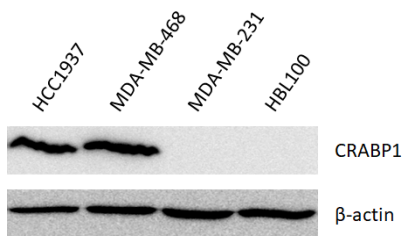
Анализ продукции CRABP1 в клетках РЯ показал, что данный белок экспрессируется в линиях OVCAR3 и OVCAR4 и не детектируется в линиях A1847, SK-OV-3 и EFO-21 (рис. 5).



**Рис. 5.** Сравнение экспрессии белка CRABP1 в клетках рака яичника.

Таким образом, «средне РК-резистентные» клетки РЯ характеризуются высокой экспрессией CRABP1, а в «максимально РК-резистентных» клетках РЯ продукция данного белка отсутствует.

Ранее при исследовании РК-чувствительности клеток РМЖ, мы не обнаружили строгой корреляции между экспрессией белка CRABP1 и РК-резистентностью, однако в группе «максимально РК-резистентных» линий клеток продукция данного белка также отсутствовала [27]. В этой связи мы далее сравнили экспрессию CRABP1 в «средне РК-резистентных» и «максимально РК-резистентных» клетках РМЖ и обнаружили ту же закономерность – «средне РК-резистентные» линии HCC1937 и MDA-MB-231 характеризовались высоким уровнем продукции CRABP1, в то время как в «максимально РК-резистентных» клетках MDA-MB-231 и HBL100 экспрессия CRABP1 отсутствовала (рис. 6).



**Рис. 6.** Сравнение экспрессии белка CRABP1 в группе ПК-резистентных клеток РМЖ.

Таким образом мы показали, что белок CRABP1 присутствует как в ПК-чувствительных клетках, так и в клетках, устойчивых к концентрациям ПК, близким к физиологическим значениям, однако утрачивается в максимально ПК-резистентных клетках. Ранее мы не обнаружили однозначной корреляции уровня ПК-чувствительности с экспрессией CRABP1 для клеток РМЖ, поскольку в максимально ПК-чувствительной линии (SKBR3) продукция данного белка отсутствовала. Это означает, что в ПК-чувствительных клетках CRABP1 может продуцироваться не всегда, и зависеть от ряда факторов, таких как экспрессия других ПК-связывающих белков, ядерных рецепторов ПК и ферментов, регулирующих ее внутриклеточный метаболизм. По мере формирования резистентности этот белок, по-видимому, необходим для регуляции активности ПК и утрачивается в максимально ПК-резистентных клетках, выживание которых не зависит от активности ПК. Эти данные хорошо согласуются с гипотетической ролью CRABP1 в качестве регулятора ядерно-цитоплазматического баланса ретиноевой кислоты. В соответствии с этой концепцией, максимально ПК-резистентные клетки не «нуждаются» в поддержании ПК в неактивном состоянии (удержании в цитоплазме), поскольку даже избыточная концентрация ПК не «угрожает» их выживанию.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о более сложной связи экспрессии CRABP1 с ПК-резистентностью: данный белок обнаруживается в клетках, которые сохраняют некоторый уровень ПК-чувствительности, в то время как в максимально ПК-резистентных клетках CRABP1 отсутствует.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Chim C.S. et al.* // *Hematol. Oncol.* 1996. 14(2): 147-54.
2. *Sanz M.A., Barragán E.* // *Clin. Hematol. Int.* 2021. 3(4): 142-52.
3. *Yilmaz M., Kantarjian H., Ravandi F.* // *Blood Cancer J.* 2021. 11(6): 123.
4. *Connolly R.M., Nguyen N. K., Sukumar S.* // *Clin. Cancer Res.* 2013. 19(7): 1651-9.
5. *Khuri F.R., Lippman S.M., Spitz M.R. et al.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1997. 89(3): 199-211.

6. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C., Berlin Grace V.M. // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2011. 33(2): 241-9.
7. Bouriez D., Giraud J., Gronnier C., Varon C. // Int. J. Mol. Sci. 2018. 19(11): 3388.
8. Nguyen P.H. et al. // Oncogene. 2016. 35(43): 5619-28.
9. David M., Hodak E., Lowe N.J. // Med. Toxicol. Adverse Drug Exp. 1988. 3(4): 273-88.
10. Campos B. et al. // Glia. 2015. 63(10): 1850-9.
11. Schug T.T., Berry D.C., Shaw N.S. et al. // Cell. 2007. 129(4): 723-33.
12. Kleywegt G.J. et al. // Structure. 1994. 2(12): 1241-58.
13. Veerkamp J.H., Maatman R.G.H.J. // Prog. Lipid Res. 1995. 34(1): 17-52.
14. Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N. // J. Biol. Chem. 1999. 274(34): 23695-8.
15. Fiorella P.D., Napoli J.L. // J. Biol. Chem. 1991. 266(25): 16572-9.
16. Napoli J., Posch K., Fiorella P., Boerman M. // Biomed. Pharmacother. 1991. 45(4-5): 131-43.
17. Perez-Castro A.V., Tran V.T., Nguyen-Huu M.C. // Development. 1993. 119(2): 363-75.
18. Lu Y. et al. // PLoS Med. 2006. 3(14): e467.
19. Liu R.-Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. // Mol. Cancer. 2015. 14(1): 129.
20. Hawthorn L., Stein L., Varma R. et al. // Head Neck. 2004. 26(12): 1069-83.
21. Tanaka K. et al. // Oncogene. 2007. 26(44): 6456-68.
22. Miyake T. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2011. 137(4): 715-22.
23. Lind G.E. et al. // Cell. Oncol. 2006. 28(5-6): 259-72.
24. Blaese M., Santo-Hoeltje L., Rodemann H.P. // Int. J. Radiat. Biol. 2003. 79(12): 981-91.
25. Pfoertner S. et al. // Tumour Biol. 2005. 26(6): 313-23.
26. Kainov Y. et al. // Cell Cycle. 2014. 13(10): 1530-9.
27. Enikeev A.D., Komelkov A.V., Axelrod M. E. et al. // Biochemistry (Mosc). 2021. 86(2): 217-29.

**ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ  
α1A-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ  
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ СЕНСИТИЗАЦИИ**

*Исмаилова Д.Х. \*, Мазалов В.В. \*, Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.*

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

\*Эти авторы внесли равный вклад в работу

**Введение.** Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в регуляции регенерации тканей. Они являются источником важнейших цитокинов, факторов роста, в том числе ангиогенных и нейротрофических. Осуществляя свою секреторную

функцию, МСК координируют рост и формирование кровеносных сосудов, а также стимулируют рост и восстановление нервных окончаний [1].

Норадреналин является ключевым регулятором функциональной активности МСК, он регулирует процессы самообновления МСК и их дифференцировки в адипоциты. При этом, как ранее было показано нами, норадреналин способен также изменять гормональную чувствительность МСК. Был обнаружен новый сигнальный феномен гетерологической сенситизации (ГС) – механизм переключения внутриклеточной сигнализации в МСК, который определяет дифференцировочную судьбу этих постнатальных стволовых клеток [2-5]. При стимуляции норадреналином или адреналином сигнального пути  $\beta$ -адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/cAMP в течение 6 часов происходит транзиторное повышение уровня экспрессии  $\alpha$ 1A-адренергических рецепторов и их сопряжение с кальций-зависимыми путями передачи внутриклеточного сигнала. Как следствие, через 6 часов после стимуляции МСК норадреналином наблюдается повышение чувствительности клеток к этому гормону [6]. Позже это было показано и для серотонина – при преинкубации МСК с серотонином наблюдалось повышение уровня экспрессии  $\alpha$ 1A-адренергических рецепторов и их сопряжение с кальций-зависимыми путями передачи внутриклеточного сигнала [6]. Была также обнаружена роль ГС в МСК жировой ткани в развитии гипертензии, связанной с ожирением – повышаемый при реализации этого механизма уровень  $\alpha$ 1A-адренорецепторов дополнительно усиливает констрикцию кровеносных сосудов в ответ на симпатическую стимуляцию при ожирении, что ведет к развитию артериальной гипертензии [7].

Данное исследование посвящено дальнейшему изучению механизма ГС. Норадреналин является стандартом в демонстрации ГС на МСК, поэтому в данном эксперименте его использовали, как индуктор. Серотонин был также использован в качестве индуктора, так как при преинкубации МСК с серотонином наблюдалось явление ГС в виде повышения уровня экспрессии  $\alpha$ 1A-адренергических рецепторов и их сопряжение с кальций-зависимыми путями передачи внутриклеточного сигнала [6]. Был расширен список потенциальных индуцирующих ГС агентов – помимо серотонина и норадреналина использовались глюкокортикоиды, а именно дексаметазон и гидрокортизон. Данные вещества были добавлены в список индукторов, так как в проделанных в нашей лаборатории экспериментах было обнаружено, что пик ГС может варьироваться от 6 до 12 часов в зависимости от донора. Исходя из этих наблюдений была выдвинута гипотеза о возможной связи феномена ГС с внутриклеточными циркадными ритмами. Чередование повышения и

понижения экспрессии белков циркадных ритмов в течение 22-26 часов циклично [8]. Из литературы известно, что один из наиболее эффективных индукторов циркадных ритмов *in vitro* является дексаметазон [8]. Гидрокортизон был добавлен в качестве его более физиологического аналога, секреция которого в организме также подчинена циркадности.

Длительность эксперимента составляла 2 суток, в течение которых определено несколько временных точек для контроля наличия ГС в клетках на конкретный момент времени. Это позволяло определить динамику переключения внутриклеточной сигнализации с одного сигнального пути на другой, а именно с сигнального пути  $\beta$ -адренорецепторы/ $G_s$  белок/аденилатциклаза/cAMP на  $\alpha_1A$ -адренергические рецепторы с сопряженными кальций-зависимыми путями передачи внутриклеточного сигнала.

**Материалы и методы. Выделение и культивирование МСК.** Первичная культура МСК была взята из биобанка МГУ имени М.В. Ломоносова [9]. Клетки велись в AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащей 10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone) и 1% раствор антибиотика, при температуре 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Пассирование МСК проводилось с помощью растворов Версена и НуQTase (HyClone). При достижении конfluenceности 90-100% клетки пересевались с разведением в 3-4 раза вплоть до 8-9 пассажа.

**Стимулирование МСК и Ca<sup>2+</sup>-сигнализация.** Активация адренергических, серотонинергических и глюкокортикоидных рецепторов оценивалась за счет регистрации Ca<sup>2+</sup>-сигнализации при действии на МСК норадреналина (Abscam, ab120717, 1 мкМ), серотонина (Abscam, ab120528, 10 мкМ), дексаметазона (100 нМ) и гидрокортизона (300 нМ). Клетки за 1-2 дня до начала эксперимента высаживались на 48-луночный планшет с небольшой плотностью, чтобы избежать контактов между клетками во время эксперимента. За 6, 16, 26, 38 и 48 часов до регистрации Ca<sup>2+</sup>-сигнализации клетки предварительно инкубировались в течение 2 часов с норадреналином, серотонином, дексаметазоном и гидрокортизоном. Несколько лунок были контрольными, к ним не добавлялся агонист, но проводились те же операции. По прошествии времени инкубации во время съемки клеток под микроскопом клетки стимулировались норадреналином, что приводило к транзиторному повышению концентрации кальция в цитоплазме клеток. Для регистрации изменения концентрации кальция клетки предварительно окрашивались в течение 1 часа флуоресцентным красителем Fluo-8 (Abscam, ab142773) в концентрации 4 мкМ в растворе Хенкса с 20 мМ HEPES. Ca<sup>2+</sup>-ответы регистрировались с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 с объективом CFI Plan Fluor DLL 10×/0.3 (Nikon) и с камерой Andor

iXon 897 (Andor Technology). Затем сравнивались ответы клеток, преинкубированных с норадреналином и серотонином, дексаметазоном, гидрокортизоном и клеток контроля. Определяемым индикатором служило повышение чувствительности клеток, преинкубированных с норадреналином, относительно клеток контроля.

**Результаты и обсуждение.** Мы показали, что дексаметазон и гидрокортизон являются индукторами ГС. Для этого использовался метод прижизненной широкопольной флуоресцентной микроскопии, с помощью которого можно было регистрировать  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию. Было установлено, что при инкубации МСК в течение 2 часов с дексаметазоном наблюдается повышение количества клеток, отвечающих через кальций-зависимый путь передачи внутриклеточного сигнала в 1.5-3 раза по сравнению с контролем в зависимости от временной точки. Для преинкубации с гидрокортизоном также наблюдалось увеличение количества клеток, реагирующих через  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию в 1.5-3.5 раза по сравнению с контролем в зависимости от временной точки. Таким образом, можно заключить, что дексаметазон и гидрокортизон являются индукторами ГС. Можно выдвинуть гипотезу о том, что ГС может возникать не только через цАМФ-зависимый путь передачи сигнала, как в случае с преинкубацией с норадреналином или серотонином, но и через ядерные рецепторы к глюкокортикоидам с последующей активацией их факторов транскрипции. Другим объяснением наблюдаемых эффектов глюкокортикоидов может служить их возможное действие на мембранные рецепторы, опосредующие быстрые ответы этих гормонов. Требуются дополнительные исследования для уточнения этого вопроса.

Согласно имеющимся к началу данной работы данным, феномен ГС происходит через 6 часов после преинкубации. Следующей измеренной временной точкой были 24 часа в которой чувствительность клеток возвращается к базальному уровню [6]. Здесь же нами было показано, что ГС обнаруживается не только во временной точке через 6 часов после преинкубации, но также и в некоторых других, более поздних, даже спустя более 1 суток для всех использованных индукторов. Для выяснения временной динамики изменения чувствительности МСК к норадреналину после индукции ГС использовался метод прижизненной широкопольной флуоресцентной микроскопии. Самое высокое значение показателя ГС наблюдалось на 16 часах при всех видах агентов для преинкубации. Клетки, преинкубированные с норадреналином, показали увеличение сигнала на 6 часах в 1.5 раза относительно контроля, на 16 часах – возрастание сигнала в 2.5 раза относительно контроля; затем на 26 часах наблюдалось значение, равное базальному уровню в контроле; на 38 часах наблюдался незначительный спад (на 30%) относительно контроля; на 48 часах – снова подъем в 2.5 раза относительно контроля. Таким образом,

мы наблюдали циклические изменения чувствительности МСК к гормонам, своей периодичностью напоминающие циркадные ритмы.

Временная картина для преинкубации с серотонином была схожа: отличалась только амплитуда повышения на 16 часах – оно было больше контроля в 2 раза, и на 48 часах – оно было больше контроля в 2 раза. Картина для дексаметазона была иной: было показано увеличение сигнала на 6 часах в 1.5 раза относительно контроля, на 16 часах – возрастание сигнала в 3 раза относительно контроля; затем на 26 часах наблюдался незначительный спад относительно контроля (на 20%); на 38 часах наблюдалось значение в 2 раза меньше контроля; на 48 часах – снова подъем в 2 раза относительно контроля. Для гидрокортизона: значение сигнала было равным контролю на 6 часах, на 16 часах – возрастание сигнала в 3.5 раза относительно контроля; затем на 26 часах наблюдалось значение, равное контролю; на 38 часах наблюдалось значение, также равное контролю; на 48 часах – снова подъем в 1.5 раза относительно контроля. Это демонстрирует цикличность процесса изменения уровня  $\alpha 1A$ -адренергических рецепторов на поверхности клеток после индукции ГС в течение суток. Можно сделать вывод о сложности этого феномена и тонкости его регуляции. При использовании всех индукторов наблюдалась схожая временная динамика повышения кальциевого ответа к исходу 16 часов после преинкубации, затем понижение сигнала до 38 часов, затем снова повышение сигнала на 2 сутки. Таким образом, это подтверждает цикличность процесса ГС при различных индукторах. Также наблюдаемая картина цикличности ГС схожа с графиком экспрессии гена циркадного ритма *Bmal1*, описанного в литературе [8], что может свидетельствовать о влиянии данного гена на сигналинг ГС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А. и др. // Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2011. 4: 32-9.
2. Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Kanareikina M.A. et al. // Sci. Rep. 2016. 6: 1-9.
3. Tyurin-Kuzmin P.A., Dyikanov D.T., Fadeeva J.I. et al. // Sci. Data. 2018. 5: 180196.
4. Tyurin-Kuzmin P.A., Karagyaur M.N., Kulebyakin K.Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21(12): 4442.
5. Chechekhin V.I., Kulebyakin K.Y., Kokaev R.I., Tyurin-Kuzmin P.A. // Front. Cell Dev. Biol. 2022. 10: 953374.
6. Чечехин В.И., Иванова А.М., Тюрин-Кузьмин П.А. // Студенческий биохимический форум. – Москва, 2018.
7. Chechekhin V., Ivanova A., Kulebyakin K. et al. // Cells. 2023. 12(4): 585.
8. Wu X., Zvonik S., Floyd Z.E. et al. // Obesity 2007. 15: 2560-70.
9. Biobank of Lomonosov Moscow State University. Available online: <https://human.depo.msu.ru/?d=H/> (accessed on 5 June 2018).

# ЛИГАНДЫ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗМЕНЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ И ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

*Мазур Д.В., Гондаренко Е.А., Кудрявцев Д.С., Антипова Н.В.*

Институт биоорганической химии, Москва, Россия

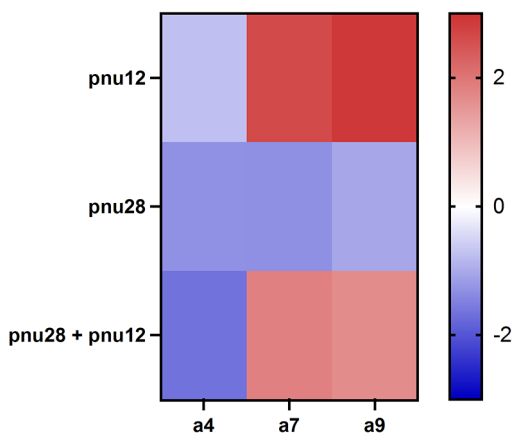
**Введение.** Мультиформная глиобластома (ГБМ) является наиболее агрессивной внутримозговой опухолью мозга у взрослых [1]. Классическое лечение ГБМ представляет собой максимальную резекцию опухолевой массы в сочетании с химиолучевой терапией с использованием темозоломида. Однако такая терапия часто бывает неэффективной, и средняя продолжительность жизни пациентов с ГБМ составляет 12-15 месяцев [2]. ГБМ является чрезвычайно гетерогенной опухолью, вследствие чего субпопуляции клеток имеют различные молекулярно-биологические особенности, а присутствие в общей популяции клеток стволовых клеток глиобластомы (СКГ) обеспечивают высокую резистентность опухоли как к радио-, так и к химиотерапии [3]. Стоит отметить, что клетки ГБМ имеют высоко инвазивные свойства и быстро мигрируют в здоровую ткань мозга, что также делает опухолевую популяцию очень опасной [4].

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) широко распространены в периферической и центральной нервной системе, регулируют развитие синапсов, жизнеспособность клеток и гомеостаз мозга. Связь nAChR с патологиями головного мозга, такими как ГБМ, все чаще документируется [5]. Уже было показано, что экспрессия  $\alpha 1$  субъединицы nAChR (кодируемой геном CHRNA1) и  $\alpha 9$  субъединицы nAChR (кодируемой геном CHRNA9) была повышена у пациентов, что приводило к снижению выживаемости [6]. Кроме того, активация  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$  субъединиц nAChR в клеточных линиях ГБМ приводила к ингибированию апоптоза и стимуляции клеточной пролиферации [7]. Более того, активация AChR увеличивала инвазию клеточных линий ГБМ, и далее этот эффект был снижен посредством блокировки рецепторов [6]. Таким образом, nAChR представляют собой многообещающую мишень для разработки инновационных противоопухолевых методов лечения, а также являются перспективной мишенью для уменьшения инвазии опухоли, такой как ГБМ.



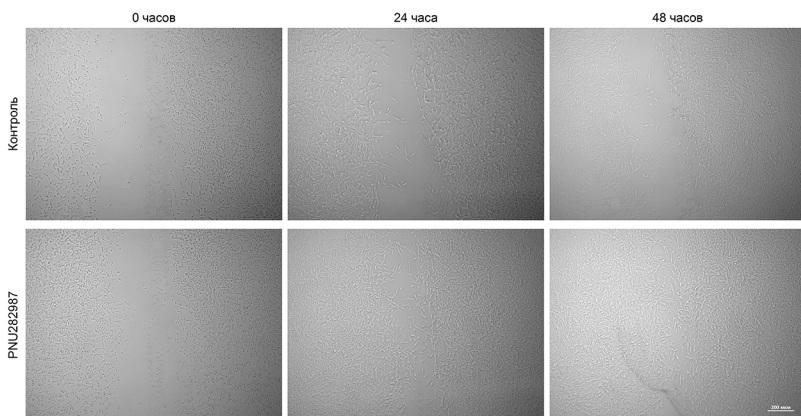
**Материалы и методы.** Культуры клеток первичной линии 019 (пронейронального подтипа) ГБМ, полученной от пациента, культивировали при температуре 37°C, 5% содержании CO<sub>2</sub> во внешней среде и 100% влажности на полной ростовой среде DMEM/F12 (10% FBS; пенициллин (100 ед/мл); стрептомицин (100 мкг/мл)) в виде прикрепленного монослоя. Экспрессию генов nAXP оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Подвижность клеток оценивали с помощью Scratch-теста.

**Результаты.** Для того, чтобы оценить влияние лигандов nAXP на экспрессию генов рецепторов на уровне мРНК, клетки инкубировали с добавлением положительного аллостерического модулятора α7 рецептора PNU120596 и селективного агониста α7 рецептора PNU282987 в течение 24 часов. Далее проводили ПЦР в реальном времени. В ходе эксперимента было показано увеличение уровня экспрессии генов α7, α9 nAXP на уровне мРНК при добавлении PNU120596, а также при добавлении модулятора и агониста вместе (PNU120596 + PNU282987) по сравнению с контролем, в то время как экспрессия гена α4 nAXP была снижена (рис. 1). Интересно то, что экспрессия генов α4, α7 и α9 nAXP была снижена после инкубации клеток с суперагонистом PNU282987 по сравнению с контролем.



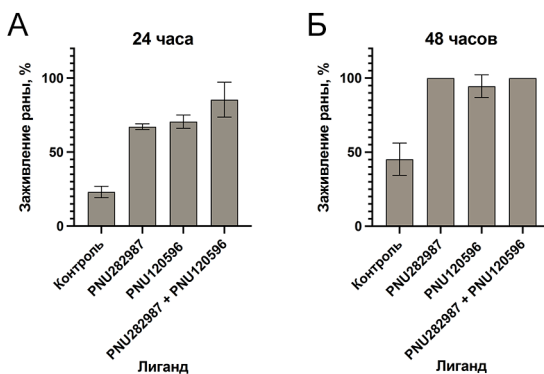
**Рис. 1.** Экспрессия генов nAXP на уровне мРНК в клеточной линии 019. Относительная экспрессия генов в образцах после добавления лиганда по сравнению с контролем рассчитывалась как значения логарифма  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  по основанию 2 и представлена в виде тепловой карты.

Для оценки воздействия лигандов nAXP на подвижность клеток был проведен Scratch-тест, при котором оценивали процент зарастания раны клетками в течение 24 и 48 часов (рис. 2).



**Рис. 2.** Анализ подвижности клеток 019 линии ГБМ с помощью Scratch-тест.

В ходе опытов было показано, что действие лигандов, изучаемых в эксперименте, приводит к стимуляции подвижности клеток (рис. 3). Можно заметить, что агонист PNU282987 и положительный модулятор PNU120596 увеличивают подвижность клеток сильнее, чем отдельно агонист и модулятор, так как при такой комбинации лигандов рецепторы активируются лучше (рис. 3А). Кроме того, воздействие агониста, а также агониста с положительным модулятором повышало подвижность клеток больше, чем воздействие только модулятора и приводило к полному застанию раны через 48 часов (рис. 3А и Б).



**Рис. 3.** Анализ подвижности клеток 019 линии ГБМ с помощью Scratch-тест. Данные посчитаны в процентах по средней ширине раны относительно 0 часов. Подсчеты произведены в трех технических повторах. А – инкубация 24 часа, Б – инкубация 48 часов, отсутствие погрешностей на графиках соответствующим PNU282987 и PNU120596 + PNU282987 связано с тем, что в трех повторах было отмечено 100% застание раны.

**Заключение.** Нами было показано, что активация нАХР суперагонистом  $\alpha 7$  рецептора PNU282987 и положительным модулятором  $\alpha 7$  рецептора PNU120596 приводит к увеличению подвижности клеток первичной культуры ГБМ. Это может свидетельствовать о том, что активация нАХР в клетках ГБМ запускает ряд сигнальных путей, участвующих в прогрессии и инвазии опухоли. Уже было показано, что увеличение инвазии клеточной линии ГБМ при активации ацетилхолиновых рецепторов (никотиновых и мускариновых) связана повышенной активностью матриксной металлопротеиназы, активность которой в свою очередь зависит от внутриклеточного кальция [6]. Однако, еще предстоит изучить подробный молекулярный механизм, связанный с повышением инвазивности опухоли, зависящий от субъединиц нАХР. При этом, стоит учитывать чрезвычайно высокую гетерогенность опухоли. Кроме того, в нашем исследовании инкубация клеток ГБМ с лигандами нАХР приводит к изменению экспрессии генов на уровне мРНК. Экспрессия  $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  была снижена после добавления суперагониста  $\alpha 7$  рецептора PNU282987 по сравнению с контролем, однако подвижность клеток после воздействия этого агониста была увеличена. Эти данные могут быть подтверждением того, что функциональная активность рецептора может не меняться даже при сниженной экспрессии гена на уровне мРНК. Однако, повышенная экспрессия  $\alpha 7$  и  $\alpha 9$  субъединиц нАХР после воздействия модулятора PNU120596 и модулятора PNU120596 и агониста PNU282987 вместе соотносится с данными Scratch-теста (воздействие лигандов приводит к увеличению подвижности клеток). Наши результаты показывают, что есть прямая зависимость между повышенной экспрессией генов и увеличением миграции клеток после активации рецепторов. Уже было показано, что экспрессия гена  $\alpha 9$  нАХР повышена в клетках ГБМ [6,7], что может влиять на инвазию опухоли у пациентов. В дальнейшем мы изучим, как блокировка рецепторов нАХР антагонистами будет влиять на миграцию клеток первичных культур ГБМ. Таким образом, изучение активности нАХР в клетках ГБМ может в дальнейшем привести к пониманию сигнальных путей, участвующих в инвазии опухоли, а также найти новую потенциальную мишень для таргетной терапии.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-10092.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Louis D.N., Perry A., Wesseling P et al.* // *Neuro Oncol.* 2021. 23: 1231-51.
2. *Hanif F., Muzaffar K., Perveen K. et al.* // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017. 18: 3-9.
3. *Sminia P, Westerman BA.* // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2016. 81(6): 1018-20.
4. *Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T.* // *Cancers (Basel).* 2022. 14(2): 443.
5. *Borroni V., Barrantes F.J.* // *Membranes.* 2021. 11(9): 664.
6. *Thompson EG, Sontheimer H.* // *Cells.* 2019. 8(10):1203.
7. *Pucci S., Fasoli F., Moretti M. et al.* // *Pharmacol. Res.* 2021. 163: 105336.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА КЛЕТОК  
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ  
В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МАТРИЦАХ С РАЗНЫМИ  
СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Поспелов А.Д.<sup>1</sup>, Гефтер С.Д.<sup>1</sup>, Карпушин М.Ю.<sup>1</sup>, Соколов А.А.<sup>1</sup>,  
Трушина Д.Б.<sup>1</sup>, Ефремов М.Ю.<sup>3</sup>, Здобнова Т.А.<sup>1</sup>, Балалаева И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>ФНИЦ Кристаллография и Фотоника РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Научно-технологический парк биомедицины  
Сеченовского Университета, Москва, Россия

**Введение.** Идея микроокружения опухоли как основного фактора, определяющего поведение опухолевых клеток, стала центральной в современной онкологии. Микроокружение опухоли включает в себя клетки различного происхождения и функций и неклеточный компонент – внеклеточный матрикс (ВКМ) [1]. ВКМ принимает активное участие в поддержании тканеспецифичного гомеостаза, определяет архитектуру ткани, служа каркасом и динамическим регулятором жизненных процессов клеток. Изменения в составе и свойствах ВКМ непосредственно вовлечены в трансформацию тканей и канцерогенез [2,3].

Целью данной работы был анализ влияния структурно-механических свойств ВКМ, характерных для различных органов мышцы, на фенотип клеток аденокарциномы молочной железы на примере экспрессии ряда маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).

**Материалы и методы.** Мыши линии BALB/C (самки, возраст 4 месяца) были получены из SPF вивария Нижегородского государственного университета имени Лобачевского (ННГУ). Животных содержали в стандартных условиях (при температуре 25-26°C и 12-часовом цикле свет-темнота), обеспечивая пищей и водой *ad libitum*. Эксперимент был одобрен Биоэтической комиссией ННГУ (протокол № 15 от 02.15.2018). Из животных извлекались образцы печени, легких, почек, селезенки и яичников, после чего из тканей получали децеллюляризованные матриксы путем последовательной инкубации в растворах детергентов 0.5% Тритон X-100, 0.5% SDS, 0.5% SDC и в 0.75% SDS. Полученные бесклеточные матриксы отмывались от детергентов, после чего насыщались ростовой средой. Заселение матриксов клетками аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 производилось путем их инъекции с последующим культивированием матриксов в планшетах из пластика со сверхнизкой адгезией. Качество

децеллюляризации органов и заселения полученных матриксов опухолевыми клетками анализировалось стандартными гистологическими методами.

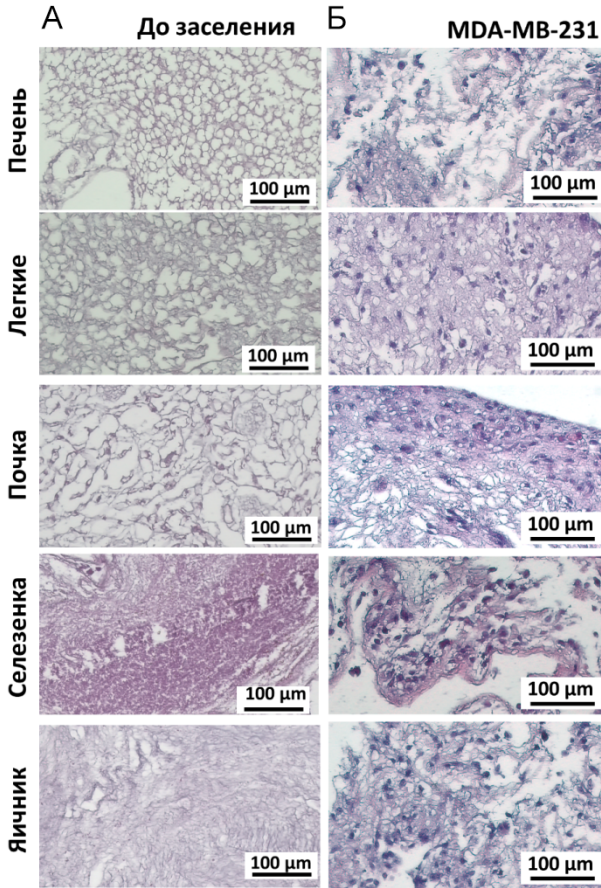
Исследование жесткости матриксов на уровне тканевой архитектуры и на уровне отдельных волокон матрикса проводилось методами макро- и наноиндентации соответственно. Макроиндентация была выполнена с использованием универсальной микромеханической системы Mach-1™ v500csst, оснащенной рубиновым индентором. Наноиндентация проводилась на атомно-силовом микроскопе Bioscope Resolve на срезах образцов. Результаты экспериментов были аппроксимированы моделью Герца, в результате чего были получены значения модуля Юнга исследуемых образцов [4].

Микроструктуру децеллюляризованных тканей и их морфологию изучали с помощью настольного сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus при напряжении 10-15 кВ в режиме обратно рассеянных электронов с тонким проводящим слоем хрома на образцах.

Анализ экспрессии маркеров ЭМП клетках MDA-MB-231, заселенных в матриксы, проводился с помощью метода ПЦР в реальном времени по методу  $\Delta\Delta Ct$  [5]. В качестве маркеров были выбраны гены, отвечающие за экспрессию транскрипционных факторов Snail и Slug, матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9), рецепторов интегрина  $\beta$  (ITGB), Notch-1 и DDR-1. Для сравнения экспрессия этих же генов была проанализирована в клетках, выращенных в монослойной культуре. В качестве референсных генов использовались гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GADPH), белка-гомолога Pumilio 1 (PUM1) и бета-актина (ACTB).

**Результаты и обсуждение.** Нами был разработан протокол децеллюляризации, подходящий для спектра органов мыши и обеспечивающий сохранение нативной архитектоники матрикса. Высокая степень элиминации клеточного компонента (>95%) была подтверждена анализом на содержание нуклеиновых кислот.

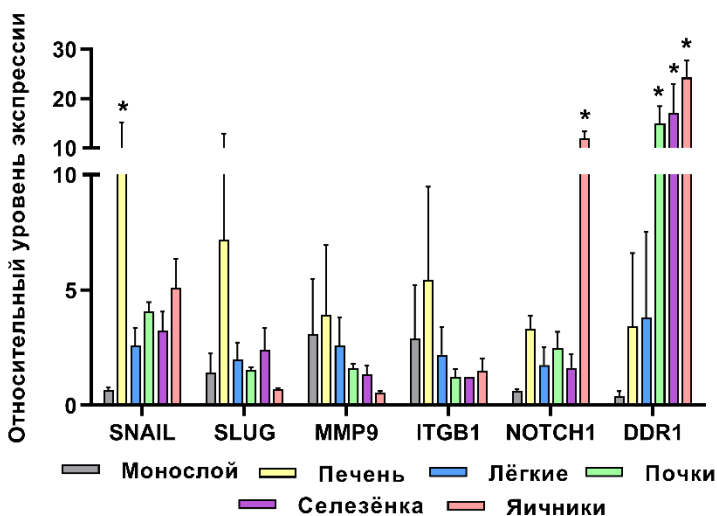
Полученные матриксы были успешно заселены опухолевыми клетками. Следует отметить, что паттерны роста клеток отличались в матриксах разных органов, что свидетельствует о сохранности тканеспецифичных свойств полученных матриксов. Наиболее выраженный рост наблюдался в матриксах легких и яичников (рис. 1). Корреляционный анализ показал, что биомеханические свойства матриксов органов играют большую роль при определении успешности инвазии и пролиферации опухолевых клеток. Для исследованной в работе линии клеток с выраженным мезенхимальным фенотипом архитектоника матрикса, пористость и общая жесткость органа оказались более важны для успеха пролиферации, чем тонкие ультраструктурные особенности матрикса. При этом большой размер пор ВКМ и низкая общая жесткость способствуют заселению матрикса клетками.



**Рис. 1.** Гистологический анализ матриксов различных органов мыши до заселения клетками (А) и заселенных клетками аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, время роста 1 неделя (Б). Окрашивание гематоксилин-эозином.

Мы предполагаем, что на начальных этапах развития клеточных ниш требуется активация генов-адаптеров для повышения шансов на успешную интеграцию в новое микроокружение [6]. Это подтверждается достоверным увеличением экспрессии Snail в матриксе печени и тенденцией к её увеличению для всех остальных органов (рис. 2). При этом тенденция к увеличению экспрессии Slug не была обнаружена. Несмотря на то, что Snail и Slug взаимодействуют для достижения схожей цели – усиления потенциала роста опухоли и индукции отдаленных метастазов,

их роли на каждом этапе процесса распространения опухоли (миграции, интра- и экстравазации, переноса в отдаленный участок, адаптации и роста интродуцированных клеток) различаются [7-8]. Эта гипотеза подтверждается отсутствием достоверных изменений в экспрессии генов металлопротеазы 9 и интегрин  $\beta$ . Одной из наиболее ярких ролей MMP9 в онкологии является связь этого фермента с ремоделированием внеклеточного матрикса и ангиогенезе. В свою очередь, интегрин  $\beta$  отвечает за создание фокальных контактов между клетками и матриксом, что обуславливает его активное участие в миграции и метастазировании. Отсутствие изменений в экспрессии этих двух генов по сравнению с монослойной культурой говорит об отсутствии активации инвазивной активности клеток, что может быть обусловлено именно адаптацией к новым условиям.



**Рис. 2.** Относительный уровень экспрессии генов-маркеров ЭМП в клетках MDA-MB-231, культивируемых в монослойной культуре или бесклеточных матриксах органов мыши в течение 1 недели. \* – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, критерий множественных сравнений Тьюки,  $p < 0.05$ ).

Не менее интересным является достоверное увеличение экспрессии Notch в матриксе яичника и тенденция к увеличению в других органах по сравнению с монослоем. Данный рецептор активируется при прямом межклеточном контакте, при котором трансмембранные белки контактирующих клеток образуют лиганды, связывающие Notch. Этот процесс обеспечивает взаимную активацию сходных признаков в

организованных группах клеток и формирование крупных структур. Можно предположить, что низкий размер пор в матриксе яичнике приводит к более плотной заселённости клеток и латеральной активации Notch сигналинга [9].

Нами было обнаружено, что после недели роста у клеток, растущих в матриксах ряда органов, достоверно повышается уровень экспрессии гена дискоидин доменного рецептора-1 (DDR-1). Этот тип рецепторных тирозинкиназ играет ключевую роль в коммуникации клеток с их микроокружением, участвуя в регуляции клеточного роста, дифференцировки и метаболизма, при этом их активация является коллаген-зависимой. Наибольшая экспрессия DDR-1 в матриксах почек, селезёнки и яичника, по всей видимости, связана с небольшим размером пор в этих органах. Вынужденное взаимодействие клеток с коллагеновыми волокнами матрикса приводит к активации дискоидин-опосредованному клетка-матриксному взаимодействию.

На основании полученных данных мы можем предположить, что органоспецифические характеристики внеклеточного матрикса играют значительную роль в регуляции процесса эпителиально-мезенхимального перехода и формировании фенотипа опухолевых клеток. При этом важными факторами являются структурно-механические свойства матрикса различных органов как один из аспектов специфического опухолевого микроокружения.

Работа выполнена в рамках проекта НЦМУ «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2022-293 от 15.04.2022.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson N.M., Simon M.C.* // *Curr Biol.* 2020. 30(16): R921-5.
2. *Cox T.R.* // *Nature Reviews Cancer.* 2021. 21(4): 217-38.
3. *Kim M., Lee C., Park J.* // *Trends Cell Biol.* 2022. 32(10): 825-34.
4. *Efremov Y.M., Shpichka A.I., Kotova S.L., Timashev P.S.* // *Soft Matter.* 2019. 15(27): 5455-63.
5. *Schmittgen T.D., Livak K.J.* // *Nat Protoc.* 20083(6): 1101-8.
6. *Hanahan D.* // *Cancer Discov.* 2022 12(1): 31-46.
7. *Haslehurst A.M., Koti M., Dharsee M. et al.* // *BMC Cancer.* 2012. 12(1): 91.
8. *Lambertini E., Franceschetti T., Torreggiani E. et al.* // *BMC Molecular Biology.* 2010. 11(1): 13.
9. *Greenwald I.* // *Genetics.* 2012. 191(3): 655-69.



# СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

*Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>, Чечехин В.И.<sup>1</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>,  
Калинина Н.И.<sup>1</sup>, Ткачук В.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

В основе здорового функционирования организма человека лежат процессы обновления клеток и тканей, а также механизмы регенерации и репарации повреждений. Ключевую роль при обновлении тканей, а также в процессе развития болезней, связанных с нарушением обновления, играют постнатальные стволовые клетки. Например, такое широко распространенное в современном обществе заболевание как ожирение связано с нарушением организменных процессов обновления и поддержания здорового состояния жировой ткани. Вызванное избыточным поступлением питательных веществ, факторами среды или генетической предрасположенностью, оно приводит к тому, что в жировой ткани нарушаются процессы закладки новых адипоцитов из резидентных стволовых клеток. В результате в жировой ткани накапливаются крупные старые гипертрофированные адипоциты, демонстрирующие нарушенную чувствительность к гормональным сигналам и отсутствие способности к продукции важных для метаболического здоровья ткани адипокинов.

В большинстве тканей мезенхимного происхождения основным источником обновления являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК, название этих клеток еще иногда расшифровывают как «мезенхимные стволовые клетки») [1]. Эти постнатальные стволовые клетки выявляются в большинстве тканей организма. Например, в случае жировой ткани, они являются предшественниками как белых, так и теплопродукующих бежевых адипоцитов, а также ключевыми регуляторами ее гомеостаза. В случае кости МСК являются предшественниками новых остеобластов и регуляторами остеосинтеза и резорбции кости [2]. МСК в ткани выполняют несколько функций [3,4]. Во-первых, МСК являются ключевыми регуляторами резидентной ткани, контролируя и модулируя процессы репарации и регенерации путем паракринной секреции факторов роста и цитокинов [5,6]. Во-вторых, МСК вступают в дифференцировку в мезенхимном направлении, характерном для резидентной ткани, что

приводит к стабильному ее обновлению. Например, в случае жировой ткани примерно 10% адипоцитов заменяется на новые каждый год в результате дифференцировки МСК [7]. Таким образом, МСК лежат в основе обновления тканей взрослого организма, участвуя в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения и паракринно регулируя этот процесс.

Процесс регенерации находится под контролем нейроэндокринных сигналов со стороны организма и внутренних паракринных сигналов ткани. Под их действием стволовые клетки дифференцируются с образованием функциональных дифференцированных клеток ткани. В нашей работе мы пытаемся выяснить сигнальные механизмы регуляции коммитирования МСК в различные направления дифференцировки и осуществления их регуляторной функции.

В условиях организма на стволовые клетки постоянно действует большое число регуляторных факторов, гормонов и нейромедиаторов. Сложно представить, чтобы действия одного какого-то фактора было достаточно, чтобы активировать стволовую клетку и направить ее в дифференцировку. Если бы это было так, то можно было бы ожидать, что при каждом повышении концентрации гормона-регулятора все или большая часть стволовых клеток рекрутировались бы в дифференцировку, и пул стволовых клеток иссяк бы уже на ранних стадиях развития организма. Поскольку этого не происходит, можно предположить существование более сложных сигнальных механизмов регуляции коммитирования стволовых клеток в направлении дифференцировки. И действительно, для запуска различных направлений дифференцировки МСК *in vitro* используют всего несколько гормонов, применяемых в различных комбинациях. Например, для направления МСК в адипогенную дифференцировку клетки недостаточно обработать только гормоном-индуктором адипогенеза инсулином, но необходимо также обработать клетки глюкокортикоидами (дексаметазон) и потенцировать цАМФ-зависимую сигнализацию путем добавления изобутилметилксантина (ИБМХ). В комплексе с цАМФ-активирующими агентами дексаметазон открывает сайты посадки цАМФ-зависимых транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, запускают экспрессию генов адипогенеза [8]. Для остеогенной дифференцировки МСК используется тот же дексаметазон, но в ассоциации с необходимой для созревания коллагена аскорбиновой кислотой и 2-глицерофосфатом как источником фосфата для формирования кальций-фосфатных минеральных отложений [9]. Дексаметазон, действуя сам по себе, активирует сигнальный путь, ассоциированный с WNT/бета-катенином, который, в свою очередь, активирует мастер-ген остеогенной дифференцировки *Runx2*. Хондрогенная дифференцировка МСК запускается сигнальным фактором TGF $\beta$  в ассоциации все с тем же дексаметазоном, причем сам по себе TGF $\beta$

направляет МСК в миофибробласт-подобный фенотип [10]. Заметим, что активируемый дексаметазоном в МСК WNT-зависимый сигнальный путь ингибирует адипогенную дифференцировку, но в комбинации с другими сигнальными молекулами этот глюкокортикоид работает в обратном направлении [11]. Таким образом, МСК не направляются в тот или иной тип дифференцировки за счет действия какого-то одного конкретного гормона или фактора роста, но для выбора клеткой направления дифференцировки требуется комплексный гормональный сигнал.

Если рассматривать возможные механизмы прохождения комплексного гормонального сигнала, инициирующего дифференцировку стволовой клетки и программирующего ее направление, то можно предположить несколько вариантов осуществления этого процесса. Во-первых, можно предположить, что несколько определенных гормонов должно одновременно подействовать на клетку-мишень и только в этом случае запускается программа дифференцировки. Другой вариант – более защищенный от случайной самопроизвольной активации – гормоны-регуляторы должны подействовать на стволовую клетку в определенной последовательности. Можно предположить, что в этом случае первый действующий гормон потенцирует и готовит стволовую клетку к восприятию следующего действующего гормона. В таком случае при изменении последовательности действия сигналов активации стволовой клетки не происходит. МСК при регуляции своей функциональной активности используют целый ряд особенных сигнальных механизмов, определяющих особенности работы этих стволовых клеток при обновлении тканей [12-14]. Так, мы показали уникальный феномен гетерологической сенситизации кальций-ассоциированных адренорецепторов в МСК [15-17]. Он заключается в том, что при действии серотонина или норадреналина на МСК происходит отложенное во времени переключение внутриклеточной сигнализации, активируемой норадреналином, с преимущественно цАМФ-зависимой на  $Ca^{2+}$ -зависимую с изменением функционального ответа клеток. Этот процесс может лежать в основе инициации клеток для вступления в дифференцировку. Мы установили, что гетерологическая сенситизация альфа<sub>1A</sub>-адренорецепторов на перичитах малых сосудов жировой ткани (которые в культуре входят в состав популяции МСК) приводит к коммитированию МСК в направлении дифференцировки в контракильные клетки, подобные гладкомышечным. Ответ МСК по механизму гетерологической сенситизации строго коррелирует с развитием артериальной гипертензии у пациентов с ожирением [18]. Таким образом, комплексный гормональный сигнал, заключающийся в действии на МСК набора регуляторов в определенной последовательности, определяет направление дифференцировки клеток.

С другой стороны, изменение формата активации сигнальных

каскадов при действии на клетки одного и того же гормона может приводить к переключению клеточного ответа МСК с пролиферации на дифференцировку, что было продемонстрировано нами на примере рецепторов ангиотензина II [19-21]. Формат активации внутриклеточных сигнальных каскадов, запускаемых одним и тем же гормоном посредством одного и того же рецептора, лежит в основе регуляции остеогенной дифференцировки МСК. Паратиреоидный гормон (ПТГ) является ключевым регулятором обновления кости за счет управления процессами остеогенеза и резорбции кости [2]. Мы показали, что при действии на МСК жировой ткани и надкостницы ПТГ запускает внутриклеточную кальциевую сигнализацию несколькими форматами: одиночные кальциевые ответы, кальциевые осцилляции и длительный плавный цАМФ-зависимый прирост внутриклеточного уровня кальция. При этом плавный прирост коррелирует с проosteогенным действием ПТГ, тогда как кальциевые осцилляции – с антиosteогенным действием того же гормона. Что важно, все эти варианты ответов могут запускаться в одних и тех же клетках, находятся в динамической конкуренции друг с другом, при подавлении одного из сигнальных ответов (например, проosteогенного) в той же клетке активируется функционально противоположный (антиosteогенный) [22].

МСК проявляют функциональную гетерогенность не только относительно кальций-мобилизующих гормонов, но также и в отношении цАМФ-ассоциированных регуляторов клеточной активности. Крайне интересно, что в этом случае функциональная гетерогенность МСК отличается от таковой, наблюдаемой для кальций-зависимой сигнализации. Как ранее было показано, МСК крайне гетерогенны по своим кальциевым ответам на гормоны. При этом каждая конкретная клетка отвечает на один, реже на два гормона несмотря на то, что большинство клеток экспрессирует все изучаемые рецепторы [23,24]. В отношении цАМФ-зависимой сигнализации МСК проявляют другой формат гетерогенности. Оказалось, что только около 40% клеток популяции экспрессируют хоть одну из 10 изоформ аденилатциклаз, получая принципиальную возможность ответить на действие гормона. Остальные клетки оказываются нечувствительными не только к цАМФ-зависимым гормонам, но и к прямому активатору аденилатциклаз форсколину. При этом, как мы показали, данная гетерогенность МСК является динамическим состоянием. При изоляции одиночных клеток и получении из них клонов, данный тип гетерогенности восстанавливается со схожими пропорциями [25]. Таким образом, функциональная гетерогенность ответов МСК на цАМФ-ассоциированные регуляторы клеточной активности связана с дифференциальной экспрессией аденилатциклаз в цитоплазме индивидуальных клеток.

Выяснение молекулярных механизмов инициации и программирования к дифференцировке постнатальных стволовых клеток является как важнейшей фундаментальной задачей, так и практически-ориентированным исследованием, которое позволит в перспективе создать принципиально новые эффективные методы терапии ожирения и профилактики ассоциированных с ним метаболических заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wang Q.A. et al. // Nat. Med. 2013. 19(10): 1338-44.
2. Воронцова М.В. и др. // Вестник РАМН. 2021. 76(5): 506-17.
3. Bourin P. et al. // Cytotherapy. 2013. 15(6): 641-8.
4. Dominici M. et al. // Cytotherapy. 2006. 8(4): 315-7.
5. Phinney D.G., Prockop D.J. // Stem Cells. 2007. 25(11): 2896-902.
6. Калинина Н. и др. // Acta Naturae. 2011. 3(4).
7. Arner E. et al. // Diabetes. 2010. 59(1): 105-9.
8. Scott M.A. et al. // Stem cells and development. 2011. 20(10): 1793-804.
9. Langenbach F. Handschel J. // Stem cell research & therapy. 2013. 4(5): 1-7.
10. Kim. W. et al. // Procl. Natl. Acad. Sci. 2014. 111(46): 16389-94.
11. Bhaskar B. et al. // Curr. Stem Cell Res. Ther. 2014. 9(6): 508-12.
12. Чечехин В., Кулебякин К., Тюрин-Кузьмин П. // Онтогенез. 2022. 53(3): 163-72.
13. Тюрин-Кузьмин П. et al. // Биохимия. 2020. 85(3): 307-23.
14. Chechekhin V.I. et al. // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022: 1512.
15. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // Sci. Rep. 2016. 6: 32835.
16. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2018. 19(12).
17. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // Sci. Data. 2018. 5: 180196.
18. Chechekhin V. // Cells. 2023. 12(4): 585.
19. Sysoeva V.Y. // Stem Cell Res. 2017. 25: 115-22.
20. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. // FEBS J. 2020. 287(6): 1076-87.
21. Ageeva L.V. et al. // Data Brief. 2018. 16: 327-33.
22. Kulebyakin K. et al. // Cells. 2022. 11(21): 3519.
23. Kotova P.D. et al. // Biochim Biophys Acta. 2014. 1843(9): 1899-908.
24. Котова П.Д. и др. // Биологические мембраны. 2013. 30(5-6): 422-9.
25. Tyurin-Kuzmin, P.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. 21(12): 4442.

\*\*\*

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ДЕЙСТВИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СИНТЕЗА СЕРТОНИНА 5-ОКСИТРИПТОФАНА НА ФОРМИРОВАНИЕ УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

*Арсланов А.И., Силантьева Д.И., Андрианов В.В.,  
Дерябина И.Б., Гайнутдинов Х.Л.*

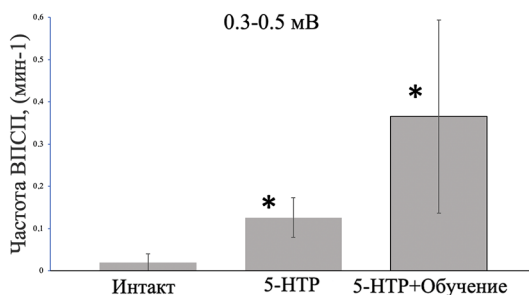
Институт фундаментальной медицины и биологии,  
Казанский федеральный университет, Казань, Россия

**Введение.** Серотонин является одним из широко распространенных и наиболее изученных медиаторов нервной системы [1,2]. Известно, что серотонин играет важную роль в процессах обучения и формирования памяти, участвует в модуляции силы синаптической связи [3-6]. Целью данной работы было исследование изменений фоновой (подпороговой) электрической активности премоторных интернейронов виноградной улитки после ассоциативного обучения при воздействии предшественника синтеза серотонина 5-окситриптофана (5-НТР). Регистрации подпороговой фоновой активности нейрона позволяет составить картину суммарной электрической активности входящих синапсов. Для реализации данной цели была поставлена задача: провести анализ изменения фоновой активности премоторных интернейронов при формировании условного рефлекса аверзии к определенному виду пищи у виноградной улитки после аппликации 5-НТР.

**Материалы и методы.** Для выполнения поставленной задачи в данном исследовании использовали внутриклеточную регистрацию активности премоторных интернейронов парietальных ганглиев виноградной улитки *Helix pomatia* крымской популяции, LPa2, LPa3, RPa3 и RPa2. Они имеют большой потенциал покоя (в районе  $-60$  мВ) и, в норме, являются молчащими. Работы проводились на изолированном препарате подглоточного комплекса ганглиев. Электрофизиологические измерения проводились при комнатной температуре с применением стеклянных микроэлектродов, имевших сопротивление 5-15 МОм и заполненных раствором 2.5 М КСl [7-9]. Добивались минимального уровня шумов при регистрации трансмембранного потенциала, что позволило обнаруживать возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) с амплитудой от 0.3 мВ. ВПСП определялись визуально по характерной форме изменения мембранного потенциала, крутому переднему фронту и плавному снижению [10]. На основании длительных (30 мин) регистраций трансмембранного потенциала, была разработана методика, позволяющая количественно оценить суммарный синаптический приток отдельного нейрона. Для исследования эффектов обучения на уровень и характер фоновой электрической активности

нейронов, у животных формировали условный рефлекс отвергания (аверзии) одного вида пищи (ПУОР, морковь), методика выработки которого описана нами ранее [8]. Перед ежедневной сессией выработки ПУОР, за 30 минут до ее начала, животные получали инъекцию 5-НТР в дозе 10 мг/кг, в 0.1 мл физиологического раствора. Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, результаты представлены в виде  $M \pm SEM$ , где  $M$  – среднее значение,  $SEM$  – стандартная ошибка среднего.

**Результаты и их обсуждение.** В фоновой электрической активности премоторных интернейронов наблюдались одиночные ВПСР различной амплитуды. Был проведен анализ частоты появления ВПСР у групп интактных животных ( $n = 5$ ), животных после аппликации 5-НТР ( $n = 5$ ) и у животных, которых обучали после аппликации 5-НТР ( $n = 5$ ). Все наблюдаемые ВПСР были разделены по величине их амплитуды на интервалы: 1) от 0.3 до 0.5 мВ, 2) от 0.5 до 1.0 мВ, 3) от 1.0 до 1.5 мВ, 4) от 1.5 до 2.0 мВ, 5) от 2.0 мВ до порога. Было найдено, что частота появления ВПСР амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ достоверно ( $P < 0.05$ ) увеличивается в группе животных получавших 5-НТР и в группе животных, которых обучали после аппликации 5-НТР (рис. 1). Достоверных изменений в частоте появлений ВПСР остальных интервалов амплитуд обнаружено не было.



**Рис. 1.** Средние значения количества одиночных ВПСР, (А) – с амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ, (Б) – с амплитудой от 0.5 до 1 мВ, с амплитудой от 1 до 1.5 мВ, (Г) – с амплитудой от 1.5 до 2 мВ.

Таким образом, было найдено, что аппликация 5-НТР у виноградной улитки приводит к достоверному увеличению частоты появлений ВПСР амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ. При этом наблюдается недостоверная тенденция к еще большему увеличению количества ВПСР этого интервала амплитуд после выработки ПУОР на фоне аппликации 5-НТР. Увеличение количества одиночных ВПСР в данном случае может говорить либо об увеличении количества ПД в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуды ВПСР ранее

не подававшихся измерению. Предпринятый нами анализ подпороговой фоновой активности молчащих премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки позволил найти изменения в синаптическом входе, связанные с воздействием предшественника серотонина 5-НТР, а также с выработкой условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии на фоне аппликации 5-НТР.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сахаров Д.А., Каботянский Е.А. // Журн. Общ. Биологии. 1986. 47(2): 234-45.
2. Gillette R. // *Integrat. Comp. Biol.* 2006. 46(6): 838-46.
3. Гайнутдинова Т.Х., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л. // Рос. Физиол. Журн. 2002. 88(2): 205-12.
4. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х. // Журн. Выssh. Нервн. Деят. 1999. 49(1): 48-58.
5. Гайнутдинов Х.Л., Гайнутдинова Т.Х., Чекмарев Л.Ю. Журн. Выssh. Нерв. Деят. 1996. 46(3): 6147.
6. Балабан П.М., Захаров И.С. // Обучение и развитие – основа двух явлений. М.: Наука, 1992.
7. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х. и др. // Журн. Выssh. Нерв. Деят. 1998. 48(6): 1004-13.
8. Гайнутдинова Т.Х., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л. и др. // Журн. Выssh. Нерв. Деят. 2003. 53 (3): 388-91.
9. Bogodvid T.Kh., Andrianov V.V., Deryabina I.B. et al. // *Front. Cell. Neurosci.* 2017. 11: 403.
10. Палихова Т.А., Маракуева И.В., Аракелов Г.Г. // Журн. Выssh. Нерв. Деят. 1992. 42(6): 1170-80.

## НЕЙРОННЫЕ СЕТИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АДИПОГЕНЕЗА В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Волошин Н.С.<sup>1</sup>, Чечехина Е.С.<sup>1</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>, Кулебякин К.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины,  
Факультет Фундаментальной Медицины,  
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт Регенеративной Медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** С середины XX века в мире неуклонно растет заболеваемость сахарным диабетом 2 типа и ожирением. В современном понимании патофизиологии этих заболеваний большую роль играет нарушение процессов обновления жировой ткани, в частности дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток



(ММСК) в адипогенном направлении [1]. Подходы *in vitro* не только позволяют моделировать данный процесс, но и изучать влияние на него различных факторов. В ходе дифференцировки клетки постепенно накапливают липидные капли в цитоплазме, а также в них повышается экспрессия ключевых генов-маркеров адипогенеза: PPAR $\gamma$ , адипонектина и других.

Основными методами оценки эффективности адипогенной дифференцировки ММСК являются ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на гены-маркеры адипогенеза и микроскопия со специфическим окрашиванием красителями, тропными к нейтральным липидам. Oil Red O является классическим примером таких красителей, он применяется для окраски липидов с 30-х годов XX века. В последнее время все чаще используется также флуоресцентный краситель нильский красный (Nile Red). Окрашенные одним из этих красителей клетки для сравнения эффективности дифференцировки могут быть подвергнуты количественному и качественному анализу, который заключается в оценке процента клеток с жировыми каплями, либо в сравнении морфологии подувшихся адипоцитов.

Однако микроскопия с окрашиванием клеток красителями, тропными к липидам, обладает рядом ограничений, когда задачей является оценка дифференцировки в динамике, например, в двух или более временных точках; в таком случае для каждой временной точки необходимо запускать дифференцировку и окрашивать отдельную лунку планшета или чашку Петри. В то же время известно, что эффективность адипогенной дифференцировки зависит от конфлюэнтности клеток при индукции [2], а из-за фактора случайности невозможно рассадить клетки в идеально одинаковой плотности; с другой стороны, в каждую лунку могут попасть клетки с разным субпопуляционным составом, что может влиять на адипогенез [3]; следовательно, эффективность дифференцировки в разных лунках может различаться. Добавление временных точек приводит и к увеличению экономических затрат на эксперимент: увеличению расхода питательной среды, индукторов дифференцировки, культурального пластика, а также времени исполнителей. Липидные капли визуализируются и при помощи прижизненных методов, в частности, фазово-контрастной микроскопии; однако на таких изображениях сложно отделить капли от других структур, поэтому анализ динамики дифференцировки по ним является крайне трудозатратным.

Преодолеть эти ограничения может использование алгоритмов компьютерного зрения, в частности, свёрточных нейронных сетей. «Pix2pix» (pixel to pixel) модели – это нейросетевые алгоритмы, которые принимают на вход изображение и на выход подают также изображение, но трансформированное по примеру обучающей выборки. Примерами таких моделей являются алгоритмы, которые трансформируют спутниковое изображение местности в картографическое, или черно-белое

изображение в цветное [4]. Pix2pix модели активно используются и в обработке микроскопных изображений для предсказания флуоресцентных изображений по изображениям, полученным с помощью методов прижизненной микроскопии [5].

В данной работе для расширения возможностей визуализации процесса адипогенной дифференцировки в динамике мы предлагаем использование pix2pix нейросети Convert.ai из модуля NIS.ai в ПО NIS Elements AR, которая строит предсказания флуоресцентных изображений с окраской Nile Red по прижизненным фазово-контрастным изображениям дифференцирующихся клеток; эта нейросеть позволит запускать в эксперимент только одну лунку и оценивать процесс дифференцировки в ней в потенциально неограниченном количестве временных точек, что снизит как экономические расходы, так и отклонения в результатах из-за различий популяций клеток в разных лунках.

**Материалы и методы.** В нашей работе использовались первичные культуры ММСК из подкожной жировой клетчатки живота, полученные от здоровых доноров, взятые из биобанка Института Регенеративной Медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. Индукция и поддержание адипогенной дифференцировки производились в 12-луночном планшете при помощи 10 мкг/мл инсулина, 0.5 мМ IBMX и 1 мкМ дексаметазона. На 14-й день дифференцировки клетки инкубировались без фиксации в растворе Хэнкса с 20 нМ HEPES и 1 мМ Nile Red в течение 1 часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Флуоресцентные изображения с окраской Nile Red, а также фазово-контрастные изображения клеток в процессе дифференцировки были получены при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti2 с камерой Kinetix (Teledyne Photometrics). Дальнейшая обработка изображений, в том числе с использованием нейросети Convert.ai, производилась в ПО NIS Elements AR версии 5.42.02.

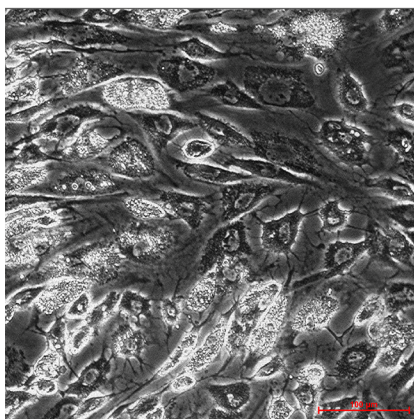
**Результаты.** Для визуализации процесса адипогенной дифференцировки мы предлагаем следующий алгоритм:

- 1) Индукция дифференцировки, запуск одной лунки планшета для всех запланированных временных точек.
- 2) Получение фазово-контрастных изображений одних и тех же клеток в запланированных временных точках, что возможно при помощи запоминания координат съемки.
- 3) Окраска клеток Nile Red и получение пар фазово-контрастное – флуоресцентное изображение в последний день дифференцировки.
- 4) Верификация существующей или обучение новой модели, строящей предсказание флуоресцентного изображения по фазово-контрастному, при помощи изображений, полученных в пункте 3.
- 5) Трансформация изображений, полученных в пункте 2, при помощи обученной модели, и построение временной развертки предсказаний флуоресцентных изображений.

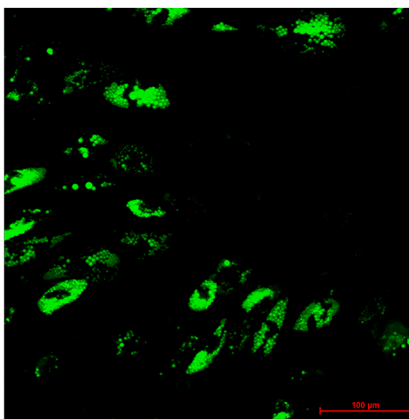
Для демонстрации принципиальной возможности получения такой модели, предсказывающей флуоресцентное изображение по фазово-контрастному, мы обучили модель Convert.ai в ПО NIS Elements AR. Для этого мы собрали 12 пар изображений фазовый контраст – окраска Nile Red клеток на 14 день адипогенной дифференцировки, 4 на 4 поля зрения 100×; 11 пар изображений, в том числе контрольные клетки без дифференцировки, были отобраны в обучающий датасет, каждое разделено на 225 (15×15) изображений 1024×1024 пикселей, пример такой пары изображений представлен на рис. 1; суммарно 2475 пар изображений. Оставшаяся пара 4 на 4 поля зрения оставлена для верификации.

Для препроцессинга использовано только контрастирование изображений с окраской Nile Red для элиминирования клеток без жировых капель, которые также визуализируются, но с намного меньшей интенсивностью, из-за аутофлуоресценции и связывания Nile Red с фосфолипидами мембран; такое контрастирование, как мы считаем, позволит снизить количество ложноположительных результатов работы модели.

Фазово-контрастное изображение



Флуоресцентное изображение

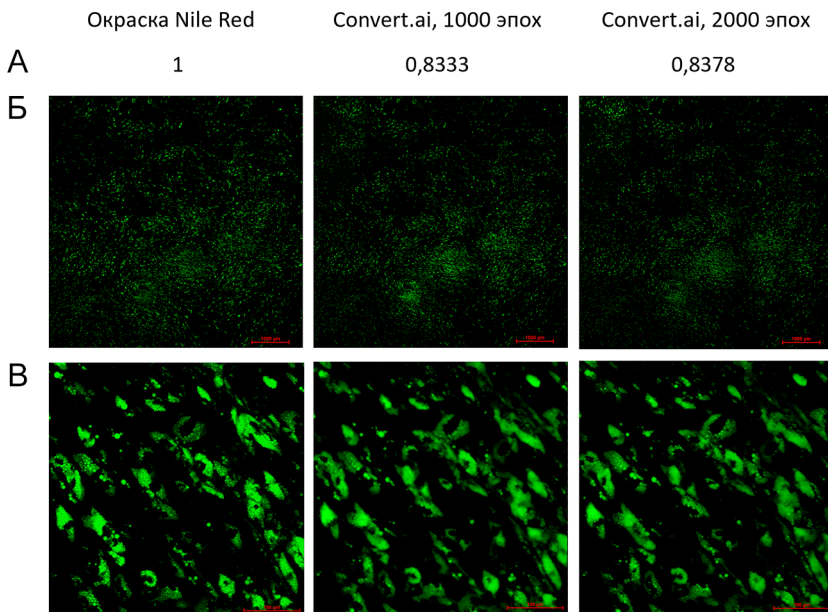


**Рис. 1.** Пример пары изображений из обучающей выборки, 1024×1024 пикселей, шкала 100 мкм. На флуоресцентном изображении с окраской Nile Red зеленый цвет – липидные капли. Модель, которая будет обучаться на таких изображениях, должна будет принимать на вход фазово-контрастное изображение и подавать на выход предсказание флуоресцентного, то есть подсвечивать липидные капли.

Полученная обучающая выборка была использована для обучения нейросети Convert.ai, использована функция Train Convert.ai в NIS Elements AR со следующими параметрами обучения: 1000

(рекомендованная разработчиком продолжительность обучения) или 2000 эпох, Dynamic Range Adaptation. После обучения полученные модели были оценены на тестовом изображении, результат представлен на рис. 2.

В качестве удобного математического выражения эффективности работы модели, доступного в NIS Elements, мы предлагаем адаптировать метрики колокализации, которые используются для оценки совпадения интенсивности сигнала на двух флуоресцентных изображениях. На рис. 2 также представлен коэффициент корреляции Пирсона для полученных предсказаний с изображением с окраской Nile Red.

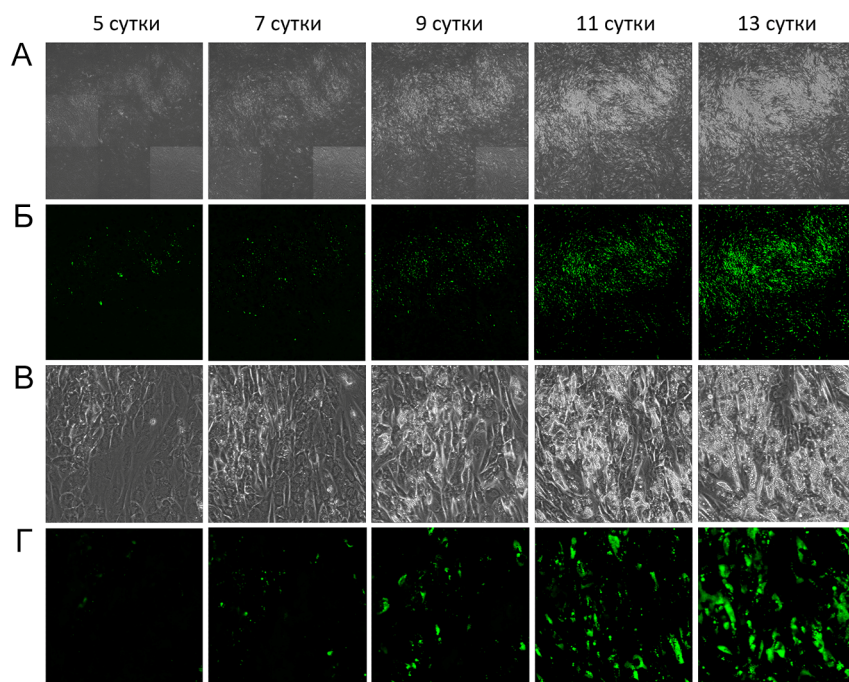


**Рис. 2.** Результаты верификации обученных моделей Convert.ai на тестовом изображении. А – коэффициент корреляции Пирсона представленного в Б изображения с изображением с окраской Nile Red. Б – изображение с окраской Nile Red и предсказания моделей Convert.ai по фазово-контрастным изображениям 4 на 4 поля зрения 100×, шкала 1000 мкм. В – соответствующие изображения 1024×1024 пикселей, шкала 100 мкм.

Полученные предсказания визуально соответствуют окраске Nile Red как на большом изображении 4 на 4 поля зрения, так и на изображениях 1024×1024 пикселей. Коэффициенты корреляции Пирсона для двух моделей с разной продолжительностью обучения отличаются на 0.0046, следовательно, дополнительные 1000 эпох не приносят соразмерного вклада в точность.

В рамках этого же эксперимента с 5-го по 13-й сутки с шагом в двое суток были получены фазово-контрастные изображения одних и тех же клеток в динамике дифференцировки. Эти изображения были обработаны полученной моделью Convert.ai (обучавшейся 2000 эпох) для визуализации динамики накопления липидных капель по предсказанным флуоресцентным изображениям. Изначальные фазово-контрастные и предсказанные флуоресцентные изображения представлены на рис. 3.

Как представлено на рис. 3, полученные модели позволяют построить временную развертку адипогенной дифференцировки в форме флуоресцентных предсказанных изображений, причем с использованием соответствующих микроскопических техник – запоминанием координат для съемки того же места в лунке в следующие временные точки – такую развертку можно построить для одних и тех же клеток.

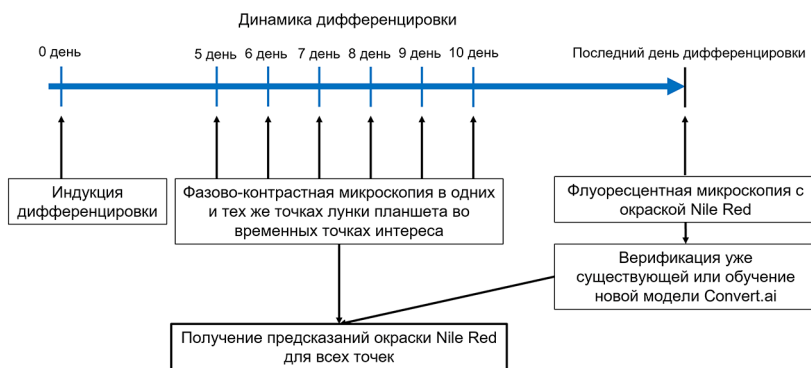


**Рис. 3.** Фазово-контрастные изображения и предсказания флуоресцентных для клеток в динамике адипогенной дифференцировки с 5-го по 13-е сутки с шагом в двое суток. Представлены изображения одних и тех же клеток во временной развертке. А – исходные фазово-контрастные изображения,  $3 \times 3$  поля зрения  $100 \times$ . Б – соответствующие предсказания модели Convert.ai по изображениям из строки А. В – фазово-контрастные изображения  $1024 \times 1024$ . Г – предсказания модели Convert.ai по изображениям из строки В.

Следовательно, модели Convert.ai могут быть использованы для построения предсказаний флуоресцентных изображений с окраской Nile Red по фазово-контрастным прижизненным изображениям и, соответственно, расширения возможностей визуализации динамики адипогенной дифференцировки.

Таким образом, мы предлагаем схему эксперимента, представленную на рис. 4.

**Обсуждение.** Предложенная нами методика визуализации динамики адипогенной дифференцировки с использованием модели Convert.ai представляет собой альтернативу общепризнанному подходу, в котором для каждой временной точки интереса выделяется отдельная лунка для покраски Nile Red.



**Рис. 4.** Схема эксперимента с использованием модели Convert.ai, предсказывающей флуоресцентную окраску Nile Red по фазово-контрастному изображению. В процессе дифференцировки производится съемка клеток в одних и тех же координатах в интересующих временных точках. В последний день необходимо окрасить клетки с Nile Red и получить флуоресцентные изображения. Следующий шаг – верификация уже существующей или обучение новой модели Convert.ai при помощи этих изображений. Затем по полученным фазово-контрастным изображениям строятся предсказания флуоресцентных изображений, с помощью которых можно сравнивать группы интереса и формулировать выводы.

Наш подход обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционным. Во-первых, он позволяет визуализировать динамику дифференцировки в одних и тех же клетках, в то время как при покраске отдельных лунок в одних и тех же группах в разных временных точках визуализируются разные клетки. Причем наблюдение за одними и теми же клетками является не только более наглядным и удобным, это позволит избежать возможных различий в результатах из-за случайных колебаний плотности посадки клеток [2] и субпопуляционного состава [3]. Во-вторых, наш подход экономически выгоден: для каждой группы интереса

нужно запускать в дифференцировку только одну лунку, а не количество, равное количеству временных точек; это позволит снизить расходы культурального пластика, среды, компонентов дифференцировочного коктейля, времени исполнителей и т.д. Особенно экономически выгоден будет подобный анализ при помощи open-source pix2pix моделей, а не на основе коммерчески доступной NIS Elements NIS.ai. Другой потенциальной проблемой этого подхода при частом его использовании являются расходы на накопители информации: при данном подходе генерируется большое количество изображений, что требует в разы больше места на жестких дисках, чем при стандартном подходе.

**Заключение.** Таким образом, мы предлагаем алгоритм визуализации динамики адипогенной дифференцировки ММСК, основанный на pix2pix модели Convert.ai, которая предсказывает флуоресцентную окраску Nile Red по фазово-контрастному изображению. Использование этого алгоритма позволит значительно снизить количество запускаемых в дифференцировку клеток, что повысит точность сравнения временных точек между собой, а также снизит экономические затраты на эксперимент.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Vishvanath L., Gupta R.K.* // J. Clin. Invest. 2019. 129(10): 4022-31.
2. *McBeath R. et al.* // Dev Cell. 2004. 6(4): 483-95.
3. *Schwalie P.C. et al.* // Nature. 2018. 559(7712): 103-8.
4. *Isola P. et al.* // arXiv:1611.07004. arXiv, 2018.
5. *Christiansen E.M. et al.* // Cell. 2018. 173(3): 792-803.

## РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ОЦЕНКИ ЭСТЕРАЗНОГО СТАТУСА ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

*Воронина П.А., Белинская Д.А., Гончаров Н.В.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

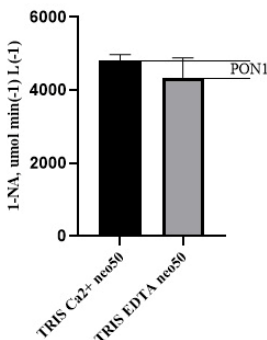
**Введение.** Кровеносная система содержит множество эстераз, специализирующихся на расщеплении сложных эфиров, которые обычно присутствуют в кровотоке или могут появляться в нем при особых диетах или заболеваниях. Большой диапазон липофильности субстратов, которые могут присутствовать в кровотоке, определяет широкий спектр эстераз, солюбилизованных в плазме, прикрепленных к стенкам кровеносных сосудов или инкапсулированных в клетки крови. Набор, количество и

соотношение активности ферментов из группы эстераз характеризует т.н. «эстеразный статус» организма. Впервые это понятие было предложено группой Г.Ф. Махаевой в 2004 году [1]. Основные эстеразы плазмы крови грызунов – это ацетилхолинэстераза (АХЭ, ЕС 3.1.1.7), бутирилхолинэстераза (БХЭ, ЕС 3.1.1.8), карбоксилэстераза (КЭ, ЕС 3.1.1.1) и параоксоназа-1 (PON1, ЕС 3.1.8.1) [2,3]. Активность этих эстераз в норме и при патологии представляет большой интерес. Также одной из задач данной работы было определить вклад сывороточного альбумина в эстеразный статус, поскольку эстеразная активность альбумина, наряду с другими свойствами, определяет его интегративную роль в организме [4-6].

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали пулированную плазму взрослых самцов аутбредных крыс линии Wistar ( $n = 10$ ). Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативному документу «Об утверждении правил лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития России от 01.04.2016 г. № 199н). Измерение общего белка пулированной плазмы крыс проводили с помощью биуретовой реакции согласно протоколу «Ольбекс». Концентрация белка составила 61 г/л. Реагенты: Этилендиаминотетраацетат (ЭДТА, ингибитор PON1), bw284c51, (bw, ингибитор АХЭ), этопропазина гидрохлорид, (etho, ингибитор БХЭ), ацетилтиохолин (АТХ), бутирилтиохолин (БТХ), фенилацетат (ФА), 1-нафтилацетат (1-НА) - Sigma Aldrich, США; хлорид кальция, Реахим, Россия; неостигмина метилсульфат, (нео, неспецифический ингибитор холинэстераз, ХЭ), Новосибирхимфарм, Россия; 2-(*o*-крезил)-4*H*-1,3,2-бензодиафосфорин-2-оксид (СВDP, ингибитор КЭ) и пальмитат натрия (palm, ингибитор карбоксилэстеразной активности альбумина) синтезированы в «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России; стандартные буферные растворы PBS «Биолот», Россия; TRIS, «Синтакон», Россия. Использован традиционный метод определения активности холинэстераз с незначительными модификациями [7,8]. При определении активности БХЭ в качестве субстрата использовали БТХ и АТХ, внося специфический ингибитор АХЭ – bw284c51. Активность АХЭ измеряли, используя в качестве субстрата АТХ. Для оценки активности КЭ использовали 1-НА в качестве субстрата. Оценку активности PON1 измеряли с использованием ФА в присутствии 2 мМ CaCl<sub>2</sub> в 0.1 М буферном растворе TRIS-HCl, pH 8.0. Измерение количества продуктов ферментативных реакций проводили в кинетическом режиме в присутствии избытка субстрата. После проведения расчета скоростей образования продуктов реакций вычисляли значения активностей соответствующих ферментов в экспериментальных и контрольных пробах, используя известные значения коэффициентов молярной экстинкции. В ходе вычислений учитывали спонтанный гидролиз субстрата.

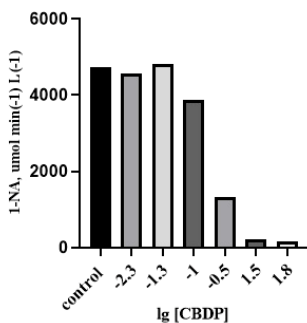


**Результаты исследования. Исследование ферментативной активности плазмы крыс по 1-НА.** В плазме крови крыс содержится большое количество КЭ, которая обладает широкой субстратной специфичностью и вносит существенный вклад в общую эстеразную активность. В данном разделе описан подбор концентраций CBDP, ингибитора КЭ, для дифференцированного анализа. Реакцию регистрировали при 322 нм на приборе Shimadzu UV-2401 PC в кварцевых кюветках, толщиной 0.5 см; время инкубации с ингибиторами – 10 мин, время регистрации кинетики реакции – 10 мин, температура инкубации и регистрации – 22°C. Активность плазмы в TRIS Ca<sup>2+</sup> с добавлением неостигмина 50 мкМ составила 4739.0 ± 277.2 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup>, ЭДТА уменьшает активность до 4470.1 ± 279.5 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup>, что соответствует активности КЭ. Следовательно, активность PON1 по 1-НА составляет 268.9 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup> (рис. 1).



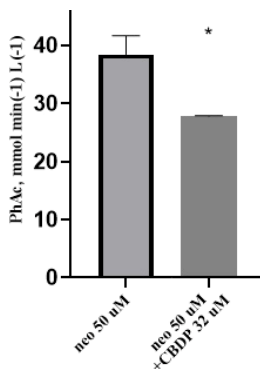
**Рис. 1.** Неспецифическая активность PON1 по 1-НА (n = 4 для каждой точки).

Для оценки ингибирующего действия CBDP увеличивали его концентрацию в TRIS Ca<sup>2+</sup> буфере до тех пор, пока не получили остаточную активность на уровне 270 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup> (рис. 2). Таким образом, минимальная концентрация CBDP, при которой активность КЭ подавлена и активность по 1-НА сведена к активности PON1 (после добавления неостигмина 50 мкМ), составляет 32.1 мкМ. При внесении CBDP 32.1 мкМ в инкубационную среду с TRIS EDTA остаточная активность равна 104.6 ± 25.6 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup>, что составляет 4.4% от исходной активности.



**Рис. 2.** Зависимость карбоксилэстеразной активности плазмы крысы по 1-НА от концентрации CBDP в TRIS Ca<sup>2+</sup> буфере (n = 4 для каждой точки).

При использовании 2-НА в качестве субстрата в среде TRIS Ca<sup>2+</sup> с применением неостигмина 50 мкМ и CBDP 32.1 мкМ активность равна 149.4 ± 51.0 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup>. В среде EDTA субстрат выпадает в осадок. Таким образом, 2-НА является неподходящим субстратом для оценки карбоксилэстеразной и параоксоназной активности.

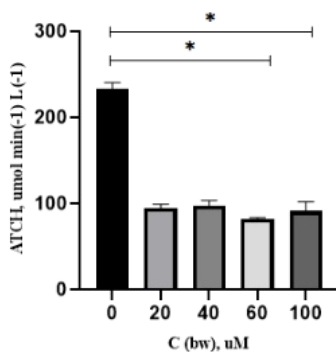


**Рис. 3.** Сравнительный анализ активности компонентов плазмы с добавлением CBDP (M ± SD, n = 4).

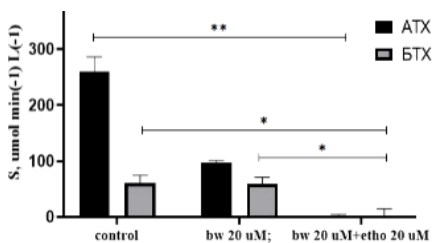
**Исследование активности компонентов плазмы крыс по фенилацетату (ФА).** Для оценки специфической активности PON1 в плазме крови человека используют ФА [9]. Поскольку ФА также является субстратом КЭ, был проведен эксперимент по определению влияния CBDP на активность плазмы крыс по ФА. Инкубацию образца проводили с добавлением неостигмина 50 мкМ для ингибирования активности ХЭ и с добавлением неостигмина 50 мкМ и CBDP 32.1 мкМ для исключения активности КЭ. На рис. 3 представлены данные активности компонентов плазмы по отношению к ФА. Установлено, что при добавлении CBDP 32.1 мкМ активность уменьшается на 10.64 мкмоль мин<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup>, что,

по-видимому, является активностью КЭ по данному субстрату. Следовательно, в плазму необходимо добавлять CBDP для оценки активности PON1.

**Оценка специфичности ацетил- и бутирилхолинэстеразы.** Для оценки активности АХЭ и БХЭ использовали субстраты АТХ и БТХ и селективные ингибиторы АХЭ – bw284c51 и БХЭ – этопропазин. Регистрировали реакцию при 405 нм на приборе Clario Star в 96-луночных планшетах фирмы «Медполимер», толщина слоя 0.85 см; время инкубации с ингибиторами – 10 мин, время регистрации кинетики реакции – 10 мин, температура инкубации и регистрации – 37°C. При проведении анализа с добавлением 20 мкМ bw284c51 остаточная активность по АТХ составляет примерно 40% от общей активности по этому субстрату. Увеличение концентрации до 100 мкМ не вносит изменений в эту остаточную активность (рис. 4). Добавление специфического ингибитора БХЭ этопропазина в концентрации 20 мкМ полностью ингибирует остаточная активность по АТХ, из чего следует, что это активность БХЭ по АТХ (рис. 5).

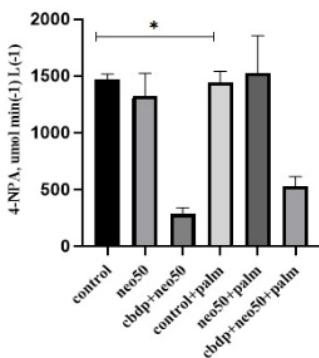


**Рис. 4.** Активность крысиной плазмы по АТХ в зависимости от концентрации bw284c51, мкМ (\* $p \leq 0.05$ , критерий Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, post-hoc тест Данна;  $n = 5$ ).



**Рис. 5.** Активность по АТХ и БТХ при последовательном введении ингибиторов; \* –  $p \leq 0.05$ ; \*\* –  $p \leq 0.01$  (критерий Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, post-hoc тест Данна;  $n = 8$ )

**Активность крысиного сывороточного альбумина.** В статье [10] было показано, что альбумин может гидролизовать параоксон. В данной работе рассматривается способность альбумина плазмы крови гидролизовать 4-НФА, безопасный структурный аналог параоксона (рис. 6). В качестве буферных растворов использовались стандартные буферные растворы PBS + ЭДТА 2 мМ и PBS + ЭДТА 2 мМ + palm 1 мМ, pH = 8.5. Дополнительно вводили ингибиторы для исключения активности КЭ и ХЭ по данному субстрату. Инкубацию с ингибиторами проводили при комнатной температуре в течение 10 мин.



**Рис. 6.** Активность плазмы крови крыс по 4-НФА с добавлением пальмитата. \* –  $p < 0.05$  (парный t-тест,  $n = 8$ , распределение нормальное, тест Шапиро-Вилка)

**Заключение.** Проведен дифференцированный анализ эстеразного статуса крови крысы, который включает в себя специфичную активность АХЭ, БХЭ, PON1 и КЭ, а также альбумина. Установлено, что для регистрации активности по АТХ и БТХ, необходимо добавлять ингибитор АХЭ – bw284c51 (20 мкМ), чтобы иметь возможность оценить активность БХЭ по АТХ и БТХ соответственно. При измерении активности АХЭ добавление ингибиторов не требуется ввиду субстратной специфичности данного фермента. Для оценки активности КЭ по 1-НА необходимо использовать TRIS буфер, содержащий ЭДТА 2 мМ для исключения активности PON1. Для оценки активности параоксоназы по ФА необходимо добавлять 32.1 мкМ СВDP, ингибитор КЭ. При измерении активности КСА ингибиторы не требуются, только преинкубация в соответствующем буфере.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sokolovskaya L.G., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V. et al. // Chem. Biol. Defence 2004. 1-2(13-14): 21-31. [in Russ.]
2. Li B., Sedlacek M., Manoharan I. et al. // Biochem. Pharmacol. 2005. 70(11): 1673-84.
3. Napon G., Dafferner A.J., Saxena A. et al. // Comp. Med. 2018. 68(5): 367-74.
4. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Vovk M.A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22: 10593.
5. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Goncharov N.V. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2021. 57(6): 1419-48.
6. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Shmurak V.I. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(19): 10318.
7. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. 7: 88-95.
8. Prokofieva D.S., Jenkins R.O., Goncharov N.V. // Anal. Biochem. 2012. 424(2): 108-13.
9. Kitchen B.J., Masters C.J., Winzor D.J. // Biochem. J. 1973. 135: 93-9.
10. Sogorb M.A., Garcia-Argtielles S., Carrera V., Vilanov E. // Chem. Res. Toxicol. 2008. 21: 1524-9.

### ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ ПОМОЩИ ТОПОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ

Крицкая К.А.<sup>1</sup>, Бережнов А.В.<sup>1</sup>, Федотова Е.И.<sup>1</sup>, Ларюшкин Д.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,

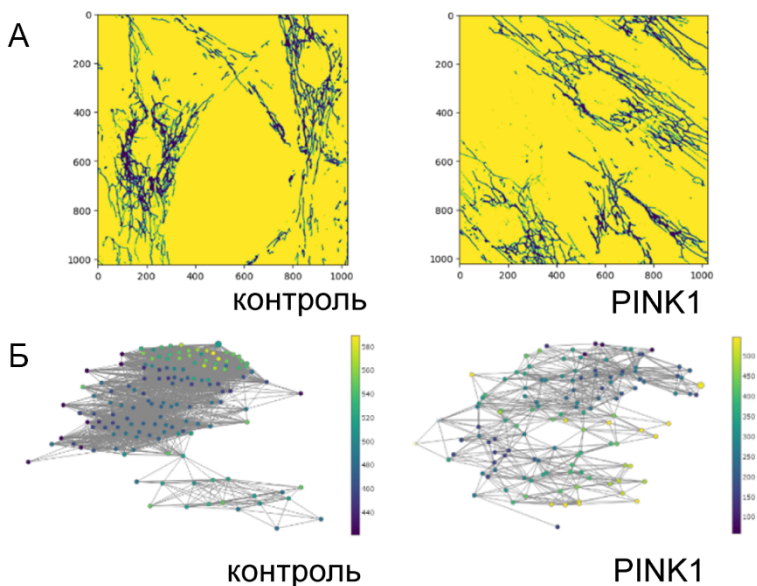
Пушино, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

**Введение.** Митохондрии — это клеточные органеллы, образующие сети. Такие сети являются динамическими структурами, постоянно реконструирующимися в ответ на различные факторы, в том числе и патологические воздействия [1]. Известно, что морфология митохондриальной сети (МС) определяется скоростями деления, слияния, изменением формы митохондрий и расположением их вдоль цитоскелета. Некоторые аспекты динамики МС, а также возможные подходы к анализу МС ранее были описаны в литературе [2]. В том числе нами было показано, что при наследственных мутациях болезни Паркинсона происходят изменения в морфологии МС [3], однако использованные подходы имеют ограничения в количестве исследуемых параметров и упускают взаимодействия более сложного уровня, таких как

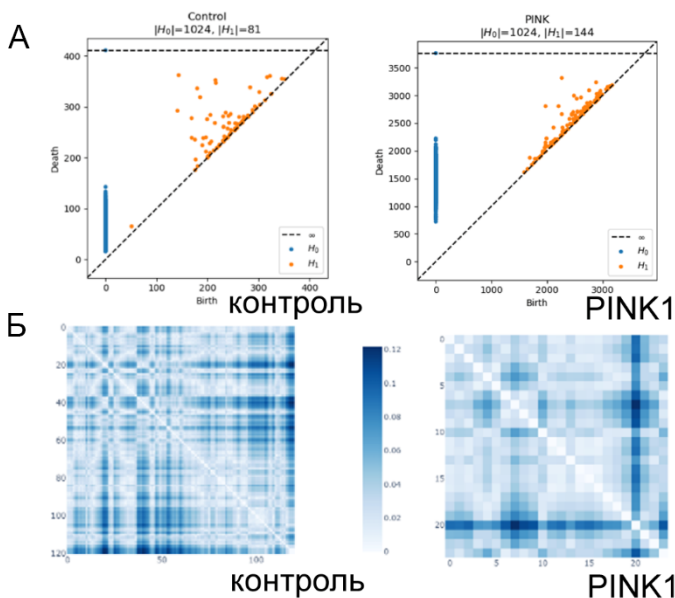
топологические структуры и гомологии [4]. На основании этого может стоять вопрос о поиске возможных метрик для топологического анализа МС. Мы предположили, что, если представить МС как граф и разбить его на симплициальные комплексы [4], возможно получить некоторую информацию о пространственной структуре МС и сравнить такие объекты в норме и при патологии. Таким образом, целью этой работы является пилотное исследование МС как топологического объекта, выделение возможных метрик, а также рассмотрение будущих перспектив такого подхода.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на культуре фибробластов, полученных от пациентов с подтверждённой болезнью Паркинсона (мутация в гене, кодирующем PINK1). Клетки загружали зондом MitoTracker Green, получали конфокальные изображения митохондрий отдельных клеток на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Топологический анализ полученных конфокальных изображений проводили при помощи языка программирования python 3 в среде разработки Jupiter Notebook с использованием пакетов: *giotto-tda*, *openCV*, *matplotlib*, *numpy*. Весь код доступен по ссылке: [https://colab.research.google.com/drive/1dFFhWLSvxhpxR-mZvC24AaaL3WXJIEM9#scrollTo=1\\_jyRcisq8Ad](https://colab.research.google.com/drive/1dFFhWLSvxhpxR-mZvC24AaaL3WXJIEM9#scrollTo=1_jyRcisq8Ad).



**Рис. 1.** А – изображения митохондриальной сети, полученные при помощи конфокального микроскопа (псевдоцвет). Б – двумерный граф, отражающий структуру митохондриальной сети.

**Результаты. Получение графа МС.** Для проведения анализа МС при помощи пакета *openCV* конфокальные изображения были загружены в рабочее окружение *python3*. Далее, изображения (рис. 1А) были представлены как матрица значений каждого пикселя ( $1024 \times 1024$ ) и передана *giotto-tda* возвращающий набор данных точек в виде двумерного графа, который представлен на рисунке 1Б. Видно, что граф, полученный на основе МС контрольных клеток (рис. 1Б), имеет большее количество вершин и рёбер в сравнении с графом (PINK1) (рис. 1Б), полученным на основе МС клетки, несущую мутацию PINK1, связанную с наследственной формой болезни Паркинсона.



**Рис. 2.** А – диаграмма персистентности, отражающая рождение и смерть симплицальных комплексов графа митохондрий. Б – тепловая карта, отражающая евклидово расстояние между точками диаграммы персистентности.

**Построение симплексных комплексов.** Далее мы применили один из популярных методов анализа топологических данных, а именно построение симплицальных комплексов. Таким образом, в структуре графа, полученного на основе МС исследуемых клеток, рождались и умирали топологические структуры, называемые гомологиями  $H_0$  и  $H_1$ , что отражается в диаграмме персистентности (рис. 2А). Из рис. 2А видно, что рождение и смерть новых гомологий различно в контроле и в клетках с мутацией PINK1. В качестве метрики для анализа диаграммы

персистентности, полученной на основе МС, мы предлагаем использовать эвклидово расстояние между точками, что в конечном итоге удобно представить в виде тепловых карт (рис. 2Б), а далее применить стандартные статистические методы. Как показал анализ эвклидовых расстояний (рис. 2Б), они значительно отличаются для контрольных клеток и клеток с мутацией PINK1 ( $p \leq 0.001$ ).

**Обсуждения.** Топологический анализ данных представляет собой набор методов, на основании которых возможно анализировать различные сетевые структуры, в том числе и МС. В работе мы рассмотрели один из возможных подходов анализа МС с использованием пакета *giotto-tda*. Мы предлагаем следующий алгоритм 1) загрузка конфокального изображения в окружение среды разработки python3 2) построение на основании изображения двух или трёхмерного графа, 3) построение диаграммы персистентности, 4) вычисление эвклидовых расстояний 5) статистический анализ или построение моделей.

Меньшее количество вершин и ребер МС в клетках с мутацией по сравнению с контрольными может говорить о нарушениях процессов слияния/деления и/или нарушении процессов деградации митохондрий. Это косвенно согласуется с нашими предыдущими данными анализа МС, где мы обнаружили изменение морфологии МС в клетках с мутацией PINK1, а именно увеличение количества индивидуальных митохондрий. Помимо этого, полученные результаты также согласуются с данными о биологической функции гена PINK1, который ответственен за синтез киназы, участвующую в направленной деградации митохондрий в процессе митофагии.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что топологический анализ данных может занять важное место в анализе МС, а различные метрики могут лечь в основу как для более глубокого понимания структуры МС в норме и при патологии. Помимо этого, описанными нами подход может быть интегрирован в качестве интерактивного инструмента в системы обработки изображений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rafelski S.M. // BMC Biol. 2013. 11: 71.
2. Fenton A.R., Jongens T.A., Holzbaur E.L.F. // Curr. Opin. Cell. Biol. 2021. 68: 28-36.
3. Sizemore A.E., Phillips-Cremins J.E., Christ R., Bassett D.S. // Netw. Neurosci. 2019. 3(3): 656-73.
4. Крицкая К.А., Ларюшкин Д.П., Федотова Е.И., Бережнов А.В. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. 2021. (1): 333-7.



## ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ МОЩНОСТЬ И ПОТЕНЦИАЛ: ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРИНЦИПЫ

*Надеев А.Д.<sup>1</sup>, Гончаров Н.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

В настоящей работе мы предлагаем концепцию цитотоксической мощности в качестве обобщающей альтернативы для количественной оценки апоптоза, некроза и других вариантов гибели клеток при действии веществ, вызывающих эти состояния. Концепция полезна для разработки новой методологии цитофизиологического скрининга препаратов, обладающих токсическим действием для одних клеток и не обладающих таким действием для других клеток, причем в одном и том же диапазоне доз, обоснованных либо диапазоном их физиологических концентраций, либо дозами потенциально терапевтических/токсических препаратов. С целью определения интервала терапевтических и безопасных доз лекарств или других химических веществ проводится изучение зависимости доза-эффект, например, как на рис. 1. Мы полагаем, что для этого необходимо разработать алгоритм с учетом нормированного количества вещества и количества клеток, взаимодействующих в течение определенного интервала времени.

Кэлвин Дэвис одним из первых предложил [1] проводить расчет цитотоксичности, в частности, пероксида водорода с учетом не концентрации, а молярного количества вещества в пересчете на определенное количество клеток. Однако он не ставил под сомнение существующие критерии цитотоксичности и пути гибели клеток: при исследовании дозовой зависимости эффекта воздействия пероксида в качестве критериев ответа клеток на воздействие разных доз служили ускорение или торможение пролиферации, признаки апоптоза или некроза, выявляемые с помощью широко распространенных и довольно неспецифических морфологических или биофизических методов оценки состояния клеток, таких как конденсация ядра, изменение мембранного потенциала, деградация митохондриальной и рибосомальной РНК, митохондриальной и ядерной ДНК. Он использовал и более тонкие методы генетического анализа – выявлял изменения экспрессии генов, но дело не в тонкости или сложности метода, а в его специфичности: без иммунологического фенотипирования эти методы не давали ничего

принципиально нового, разве что способствовали некоторому повышению точности существующих методов оценки состояния клеток в соответствии с существующей довольно грубой «квантованной» классификацией этих состояний.

В работе 2010 г. Майкла Гюльдена [2] из немецкого института токсикологии и фармакологии в Киле был сделан шаг вперед в представлениях об алгоритме расчета эффектов пероксида водорода при воздействии на клетки – помимо дозовой была введена временная составляющая, но опять же он использовал общепринятые и неспецифические для разных клеток критерии оценки их состояния.

Параллельно развивалось другое направление: начиная с 2009 г. каждые 3 года по инициативе Гвидо Кремера (Guido Kroemer) публиковались фундаментальные статьи Номенклатурного комитета клеточной гибели (the Nomenclature Committee on Cell Death), в одной из которых, вышедшей в 2012 г., были не только поставлены под сомнение существующие критерии состояния и путей гибели клеток, но впервые было заявлено о том, что для оценки состояния клеток надо использовать биохимический и/или иммунологический профиль (статус) клеток, т.е. использовать фенотипирование для оценки градуальных изменений состояния клеток.

Суть предлагаемой нами концепции цитотоксической мощности состоит в следующем: гибели клеток предшествует градуальное изменение количества (экспрессии, активности) внутриклеточных функциональных структур; характер и скорость такого изменения может быть охарактеризована динамикой экспрессии фенотипических маркеров, являющихся частью этих структур, на основании расчета соотношения абсолютных количеств действующего вещества и клеток.

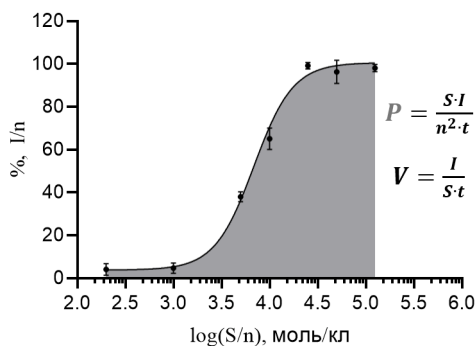
Совокупность фенотипических маркеров (фенов) – феном, результат взаимодействия генома клетки с факторами среды, включающий в себя элементы генома, транскриптома, протеома, метаболома, интерактома. Фены специфичны для разных типов клеток и характер их проявления свидетельствует не только и не столько о «здоровье» клетки, не только и не столько о вероятности и характере ее гибели, но прежде всего о функциональном состоянии клетки.

Воздействие же выражается в интенсивности развития специфических ( $I$ ) процессов, в клетках при действии определенного количества вещества на определенное количество клеток.

Цитотоксическую мощность воздействия (формула 1) ( $P$ ) можно представить как произведение количества вещества ( $S$ ) в молях, действующего на  $n$  клеток, на интенсивность развития цитотоксических процессов ( $I$ ) в том же количестве клеток ( $n$ ) за единицу времени ( $t$ )

$$P = \frac{S \cdot I}{n^2 \cdot t} \quad (1)$$

Условной единицей измерения цитотоксической мощности вещества предлагаем считать «моль-фен» – количество вещества (в молях), изменяющее за единицу времени час с момента воздействия на  $n$  клеток интенсивность изменения количества функционально сопряженных фенотипических маркеров (фенов). Численно мощность воздействия, вычисляется как площадь под кривой доза-эффект (рис. 1). Это мощность воздействия для проявления того или иного пути гибели, или просто реакции, стресса, патологии и т.д. Ведь при одном и том же воздействии, вещество и его количество/доза, при использовании разных маркеров и зондов для их выявления, возникает спектр разных эффектов, более или менее чувствительных/специфичных по отношению к одному и тому же воздействию.



**Рис. 1.** Характерная кривая доза-эффект. Принципы расчёта цитотоксической мощности  $P$  – площадь под кривой; и цитотоксического потенциала  $V$  – наклон линейного участка.

Важнейшим компонентом формулы цитотоксической мощности является показатель  $I$  – индекс, количественно характеризующий развитие того или иного цитотоксического процесса в клетках. Здесь следует напомнить, что при определении типа гибели клеток используют распространенные методы оценки жизнеспособности клеток, с помощью которых можно выявлять их определенные дискретные состояния, но нельзя понять предысторию возникновения данного состояния и вектор дальнейшего развития. Понятно, что для уточнения степени и характера повреждения клеток при воздействии токсического агента необходимо иметь информацию не только о маркерах терминального, дискретного состояния, но и о менее специфических маркерах, раскрывающих «второстепенные» стороны жизни клеток. Ранее [3,4] нами было установлено, что иммунологический фенотип ЭК пупочной вены человека

в культуре при действии  $H_2O_2$  подвержен градуальным дозо- и время-зависимым изменениям экспрессии индуцибельных CD-маркеров, т.е. с помощью универсальных показателей цитотоксичности можно использовать тканеспецифические показатели – компоненты фенома, концентрация которых градуально увеличивается или уменьшается, прежде чем наступит гибель клетки. Такое изменение мы предлагаем также оценить следующим способом: по величине цитотоксического потенциала.

Цитотоксический потенциал ( $V$ ) вещества можно представить как отношение количества внутриклеточных цитотоксических процессов  $I$  (определяемого по уровню активности определенных ферментов или экспрессии определенных маркеров) к количеству действующего на клетки вещества в молях ( $S$ ) за единицу времени ( $t$ ) (формула 2).

$$V = \frac{I}{S \cdot t} \quad (2)$$

Численно цитотоксический потенциал вычисляется как наклон линейного участка (30-70%) кривой доза-эффект (рис. 1.).

**Заключение.** Предложено ввести понятие цитотоксической мощности в качестве обобщающей альтернативы существующим понятиям, характеризующим процесс гибели клеток. Суть предлагаемой концепции состоит в следующем: гибели клеток предшествует градуальное изменение количества (экспрессии, активности) внутриклеточных функциональных структур; характер и скорость такого изменения может быть охарактеризована динамикой экспрессии фенотипических маркеров, являющихся частью этих структур, на основании расчета соотношения абсолютных количеств действующего вещества и клеток.

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке госпрограммы 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wiese A.G., Pacifici R.E., Davies K.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. 318(1): 231-40.
2. Gülden M., Jess A., Kammann J. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2010. 49(8): 1298-305.
3. Кудрявцев И.В., Гарнюк В.В., Надеев А.Д., Гончаров Н.В. // Биологические Мембраны. 2013. 30(5-6): 1-7.
4. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Надеев А.Д. и др. // Биологические Мембраны. 2018. 35(1): 16-26.

# ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОГО АЛГОРИТМА РАСЧЕТА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НА ПРИМЕРЕ ДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ ТОКСИКАНТОВ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ VERO CCL-81 И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

*Надеев А.Д.<sup>1</sup>, Трулев А.С.<sup>2</sup>, Рубинштейн А.А.<sup>2</sup>,  
Кудрявцев И.В.<sup>2</sup>, Гончаров Н.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований

Российской академии наук», Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Для репрезентативной количественной оценки и качественной характеристики действия веществ необходимо разработать особый алгоритм с учетом нормированного количества вещества и количества клеток, взаимодействующих в течение определенного интервала времени. Существующие способы «количественного» описания цитотоксического действия, такие как «апоптотный потенциал» и «апоптотный индекс» [1-5] для этого не пригодны. В качестве альтернативы вышеуказанным понятиям, характеризующим развитие апоптоза, некроза и других типов гибели клеток, была предложена концепция цитотоксической мощности [6-8]. Суть предлагаемой концепции состоит в следующем: гибели клеток предшествует градуальное изменение количества (экспрессии, активности) внутриклеточных функциональных структур; характер и скорость такого изменения может быть охарактеризована динамикой экспрессии фенотипических маркеров, являющихся частью этих структур, на основании расчета соотношения абсолютных количеств клеток и действующего вещества. В качестве модельных цитотоксикантов в этой работе мы использовали йодуксусную кислоту и пероксид водорода.

Таким образом, цель данной работы – на основании экспериментальных данных о цитотоксическом действии пероксида водорода и йодацетата на клетки линии Vero CCL-81 и эндотелиальные клетки (ЭК) пупочной вены человека, рассчитать параметры цитотоксической мощности.

**Материалы и методы.** Эндотелиальные клетки выделяли из пупочной вены человека и культивировали по описанной методике [9] с модификациями [10,11]. Пупочную вену промывали раствором Хенкса с антибиотиками, после чего заполняли средой 199, содержащей 0.1%

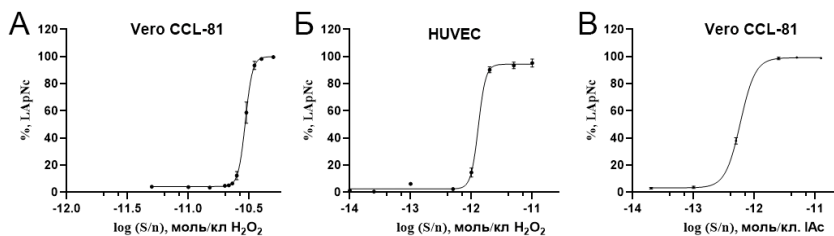
коллагеназы, и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Полученные клетки промывали и выращивали в пластиковой посуде, покрытой 0.2% желатином, используя среду E199 с 20% FBS, 300 мкг/мл эндотелиальной ростовой добавки (Sigma), 100 мкг/мл гепарина и 100 мкг/мл гентамицина. В работе использовали клетки 2-4-го пассажей, находящиеся в плотном монослое (80-100 тыс. кл./см<sup>2</sup>) в 24- или 96-луночных планшетах.

Клетки линии VERO CCL-81 культивировали при 37°C в питательной среде DMEM с глутамином и глюкозой 4.5 г/л, 5% эмбриональной сывороткой коров (ЭСК), L-глутамином (300 мкг/мл), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали клетки, находящиеся в плотном монослое (100 тыс. кл./см<sup>2</sup>) в 24-, 96-луночных планшетах. Для посева или проведения экспериментов клетки снимали с помощью раствора аккутазы (Sigma). Цитотоксическое действие оценивали через 24 ч после добавки исследуемых токсикантов – пероксида водорода (Реахим) и йодацетата (Sigma).

Окрашку антителами производили в соответствии с рекомендациями производителей, негативным контролем служили соответствующие изотипические антитела. Для оценки жизнеспособности клеток и механизма их гибели использовали флуоресцентные красители RO-PRO-1 (250 нМ) и DRAQ7 (3 мкМ). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США), анализ результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter).

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 (А-В) представлены дозовые зависимости действия модельных токсикантов на ЭК клетки и клетки линии Vero CCL-81. На рис. 1А видно, что при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на клетки линии Vero CCL-81 в дозах более 30 пмоль/кл имеет место значительная гибель клеток: не более 3% клеток остались жизнеспособными. LD<sub>50</sub> составила 29.4 ± 1.2 пмоль/кл. При действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на ЭК (рис. 3Б) близкий к 100% эффект клеточной гибели наблюдается для доз более 2 пмоль/кл. При действии доз менее 0.9 пмоль/кл цитотоксического эффекта не наблюдалось. Полумаксимальная цитотоксическая концентрация составила 1.30 ± 0.09 пмоль/кл. Цитотоксическое действие йодацетата на клетки Vero CCL-81 характеризуется LD<sub>50</sub> на уровне 0.59 ± 0.06 пмоль/кл (рис. 3В).

Полученные данные были обработаны для расчета количественных характеристик цитотоксического эффекта по предложенному нами методу [7], основанному на концепции «цитотоксической мощности» [6]. Были рассчитаны следующие параметры: LD<sub>10</sub>, LD<sub>90</sub>, «цитотоксическая мощность», определяемая как площадь под кривой [7], и «цитотоксический потенциал», определяемый как наклон линейного (30-70%) участка [7]. Результаты представлены в табл. 1.



**Рис. 1.** Кривые доза-эффект для действия модельных токсикантов. А-Б для действия  $H_2O_2$  на клетки линии Vero CCL-81 (А) и ЭК (Б). В – для действия йодацетата (IAc) на Vero CCL-81. По оси абсцисс – % клеток, находящихся в стадии позднего апоптоза/некроза.

**Табл. 1.** Цитотоксические показатели действия модельных токсикантов на два типа клеток.

Токсикант/ клетки	Мощность воздействия вещества, мольфен/сут	Цитоток- сический потенциал, фен/моль × сут	LD10, пмоль/кл	LD90, пмоль/кл	LD50, пмоль/кл
$H_2O_2$ / HUVEC	88.78±1.16	1.022	0.93	1.98	1.30±0.09
$H_2O_2$ / Vero CCL-81	26.10±1.37	0.114	24.41	34.00	29.4±1.2
Йодацетат/ Vero CCL-81	134.00 ±1.28	0.221	0.28	1.12	0.59±0.06

Сравнивая полученные данные для действия  $H_2O_2$  на разные типы клеток, можно заметить, что при действии  $H_2O_2$  на ЭК цитотоксическая мощность и потенциал составили 88.78 моль-фен/сут и 1.022 фен/моль×сут, соответственно, в то время как при действии  $H_2O_2$  на клетки Vero CCL-81 26.10 моль-фен/сут и 0.114 фен/моль×сут. При этом при действии другого токсиканта – йодацетата – на клетки Vero CCL-81 его цитотоксическая мощность и потенциал составили 134.0 мольфен/сут и 0.221 фен/моль×сут.

**Заключение.** Использование таких параметров как цитотоксический потенциал и цитотоксическая мощность позволяет проводить сравнительный анализ и делать выводы о протекании токсического процесса в различных условиях, но на основании расчета соотношения абсолютных количеств действующего вещества и клеток. Концепция цитотоксической мощности и представленные данные актуальны для развития методов цитофизиологического скрининга токсических веществ и могут быть востребованы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при сравнительном анализе действия веществ разной природы.

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке госпрограммы 075-00967-23-00.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuwashima Y., Uehara T., Kishi K. et al.* // Int. J. Gynecol. Pathol. 1995. 14(1): 45-9.
2. *Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T. et al.* // Nature. 1996. 379(6560): 88-91.
3. *Potten C.S.* // Br. J. Cancer. 1996. 74(11): 1743-8.
4. *Henery S., George T., Hall B. et al.* // Apoptosis. 2008. 13(8):1054-63.
5. *Ghasemnezhad R, Mohammadghasemi F, Faghani M, Bahadori MH* // Iran J. Reprod. Med. 2015. 13(5): 283-90.
6. *Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Надеев А.Д. и др.* // Биологические Мембраны. 2018. 35(1): 16-26.
7. *Надеев А.Д., Гончаров Н.В.* // см. в настоящем Сборнике.
8. *Надеев А.Д., Гончаров Н.В.* // Систем. Биол. Физиол. 2022. S1: 61.
9. *Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.* // J. Clin. Invest. 1973. 52(11): 2745-56.
10. *Danilov S.M., Allikmets E., Martynov A.* // J. Cell Biol. 1984. 99: 274.
11. *Goncharov N.V., Sakharov I., Danilov S.M., Sakandelidze O.G.* // Bull. Exp. Biol. Med. 1987. 104(3): 1324-6.

## МЕХАНИЗМЫ ОСТРОГО ПОЧЕЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В НОВОЙ МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ

*Плотников Е.Ю.<sup>1</sup>, Брезгунова А.А.<sup>2</sup>, Андрианова Н.В.<sup>1</sup>, Попков В.А.<sup>1</sup>,  
Ткачев С.Ю.<sup>3</sup>, Манских В.Н.<sup>1</sup>, Певзнер И.Б.<sup>1</sup>, Зорова Л.Д.<sup>1</sup>, Тимашев П.С.<sup>3</sup>,  
Силачев Д.Н.<sup>1</sup>, Зоров Д.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Введение.** Острое почечное повреждение (ОПП) является серьезным заболеванием с высокой смертностью и отсутствием таргетной терапии. Необходимо более детальное понимание молекулярных механизмов повреждения и регенерации почек. Имеющиеся в настоящее время модели ОПП вызывают поражение всей почки, поэтому особый научный интерес представляет разработка моделей, которые вызывали бы повреждение только отдельных участки почки. Такой подход может помочь дифференцировать процессы, происходящие в поврежденных и соседних участках.

Мы предполагаем, что ишемия почек, вызванная фототромбозом, может восполнить этот пробел и быть полезной моделью для лучшего



понимания молекулярных механизмов повреждения и регенерации почек. Впервые фототромбоз с помощью бенгальского розового был проведен в 1985 году Уотсоном и соавторами как метод моделирования фокального инсульта головного мозга [1] и широко используется для экспериментальных моделей инсульта и поныне [2]. Модель фототромбоза проста в реализации, что определяет ее активное использование в нейробиологии. Однако, эта модель ранее не была адаптирована для других органов. Учитывая широту применения фототромбоза для моделирования инсульта, мы предполагаем, что этот метод может быть успешно применен для моделирования ишемических патологий различных органов, включая почки.

Целью этого исследования была разработка модели фототромбоза почки и описание реализующихся при таком повреждении механизмов.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на беспородных белых крысах возрастом 3-4 месяца. Наркотизированным животным проводили внутривенную инъекцию 3% раствора Бенгальского розового в дозе 40 мг/кг, через 5 минут освещали локальную зону почки лазером 585 нм в течение 10 минут. Через 6, 24 или 48 часов у крыс собирали кровь и мочу для анализа маркеров повреждения почки (креатинин, мочевины и NGAL), проводили оценку жизнеспособности клеток, проницаемости стенки кровеносных сосудов и размера очага повреждения. Кроме того, получали срезы фиксированной ткани почки, на которых проводили гистологическое исследование методами окраски гематоксилин-эозином, ШИК-реакцию (реакция Шифф-йодная кислота), окраски на ретикулин и фибрин, а также иммунофлуоресцентное окрашивание на такие белки, как  $\beta$ -актин, KIM-1 (молекула повреждения почек 1), PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток).

**Результаты.** В исследовании использовали окрашивание трифенилтетразолием (ТТС) для визуализации поврежденной ткани и микро-КТ-сканирование для определения объема и морфологических изменений зоны инфаркта в почках. С помощью микро-КТ также оценивали изменения в паренхиме и клубочках, которые впоследствии были подтверждены гистологическим анализом. Плотность сигнала микро-КТ в области ишемизированной паренхимы была снижена через 24 часа после травмы, в то время как в клубочках наблюдалась более высокая интенсивность сигнала, особенно через 48 часов после травмы. Поврежденные клубочки содержали больше эритроцитов, что может объяснять их более высокий сигнал на микро-КТ изображениях.

Использование различных гистологических методов показало, что индукция фототромбоза вызвала серьезное повреждение канальцев и клубочков с потерей ядер и щеточной каемки в некоторых клетках канальцев, что указывает на апоптозную гибель клеток. Выявлено накопление фибрина в сосудистом пространстве, что подтверждает

развитие тромбоза сосудов. В канальцах в зоне повреждения и прилежащей почечной ткани наблюдались гиалиновые цилиндры и десквамация эпителия.

Фототромбоз приводил к повышению уровня маркеров повреждения и пролиферации, оцененных с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. В интактной ткани почки KIM-1 обычно не обнаруживается, но его экспрессия быстро возрастает в течение нескольких часов после повреждения [3]. Действительно, уровни KIM-1 были выше в очаге поражения и окружающих тканях через 24 и 48 часов после повреждения по сравнению с интактной почкой. Окрашивание срезов почек на маркер PCNA, уровень которого отражает активность пролиферации и регенерации тканей [4], выявило, что экспрессия PCNA была, в основном, локализована в KIM-1-положительных канальцах. Двойное окрашивание антителами против  $\beta$ -актина и PCNA показало, что PCNA-позитивные клетки преимущественно принадлежали к канальцам в ткани, прилегающей к зоне инфаркта, с большим увеличением их числа через 48 часов после фототромбоза.

Дисфункция почек была оценена путем измерения концентраций мочевины и креатинина в сыворотке крови, которые являются общепринятыми маркерами ОПП в клинической практике [5]. Фототромботическое повреждение не вызвало значительного повышения уровней мочевины и креатинина, поэтому мы дополнительно оценили уровень липокалина, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой (NGAL) в моче, поскольку этот маркер более чувствителен к ОПП, чем мочевина и креатинин крови [6]. Мы обнаружили увеличение уровня NGAL в моче через 6 и 24 часа после фототромбоза, тогда как через 48 часов после ишемии NGAL снизился до контрольных значений.

Кроме того, мы косвенно оценили повреждение почек с помощью теста на проницаемость сосудов с использованием синего красителя Эванса (Evans Blue). Evans Blue связывается с сывороточным альбумином и обычно остается в кровотоке [7], не проникая в ткани. При повреждении сосудов или повышении проницаемости их стенок может наблюдаться выход Evans Blue из кровотока с окрашиванием окружающих тканей [8]. После фототромбоза мы обнаружили экстравазацию Evans Blue в ткани почки вокруг очага фототромбоза как через 24, так и через 48 часов после травмы, что указывает на наличие повреждения сосудистой стенки в течение, по меньшей мере, 2 дней.

Дополнительно мы исследовали не только острые эффекты ишемии почек, вызванной фототромбозом, но и долгосрочные последствия, такие как фиброз почек. Окрашивание гематоксилин-эозином четко продемонстрировало поражение, сохраняющееся через 1 месяц после фототромбоза. Кроме того, мы наблюдали развитие фиброза ткани, в

частности, обнаружили незрелые коллагеновые волокна в области инфаркта при окраске по Массону. Мы также выявили значительную кальцификацию в очаге поражения с помощью специфического окрашивания по фон Косса на отложения кальция, что является хорошо описанным признаком фиброза почек [9]. В качестве дополнительного маркера фиброза и воспаления в почечной ткани мы оценили содержание CD163<sup>+</sup> макрофагов [10] и выявили их как в очаге ишемии, так и в окружающих тканях через 1 месяц после фототромбоза почек.

**Обсуждение.** В нашем исследовании предложен и апробирован новый метод моделирования локальной ишемии почки с использованием фототромбоза, который создает воспроизводимое ишемическое поражение в коре почки. Повреждение возникает в результате фотоиндуцированной активации фотосенсибилизатора при воздействии зеленого света, что приводит к образованию свободных радикалов, повреждению кровеносных сосудов и инициации каскада тромбообразования в мелких сосудах, вызывающих локальный ишемический очаг. Этот метод имеет преимущества перед другими моделями ишемии, включая четко определенное расположение очага, хорошую воспроизводимость и минимальную инвазивность. Мы также проанализировали долгосрочные последствия ишемии почек, вызванной фототромбозом, такие как почечный фиброз и воспаление.

Наша работа доказывает, что модель фототромбоза почек может быть использована для индукции фокального повреждения почечной ткани в экспериментальных исследованиях. Данный метод приводит к формированию небольшой области инфаркта, объем которой можно варьировать интенсивностью луча, продолжительностью облучения и концентрацией бенгальского розового. Кроме того, мы показали, что микро-КТ является мощным методом визуализации ишемического повреждения и может дать дополнительные морфологические характеристики повреждения. Выявленные при фототромбозе почек патологические изменения сходны с таковыми при конвенциональном ишемическом повреждении почек, то есть повторяют патогенетические механизмы ОПП, но в локальной области.

Мы считаем модель индуцированной фототромбозом ишемии перспективным методом изучения механизмов регенерации почки, которая до сих пор до конца не изучена. Эта модель может дать полезную информацию о происхождении клеток, участвующих в регенерации почки после повреждения, поскольку позволяет оценить особенности регенерации в локализованном поражении с четким разграничением между поврежденной и здоровой тканью. В частности, мы показали колокализацию поврежденных и PCNA-позитивных клеток и значительное увеличение количества PCNA-позитивных клеток в зоне, прилегающей к очагу ишемии, что указывает на активацию регенерации именно в этой области, аналогичной зоне «полутени» при инсульте.

Отметим, что поскольку площадь инфаркта была небольшой, то признаки остро́го повреждения почек были относительно умеренными, хотя уровень белка NGAL в моче, особенно через 6 часов после фототромбоза, однозначно свидетельствует о развитии ОПП. Через месяц после травмы зона поражения была заполнена незрелыми коллагеновыми волокнами и отложениями кальция, а в окружающих тканях присутствовали M2-макрофаги, что указывает на начало регенерации тканей.

Таким образом, мы описали новую модель локального повреждения почек в результате ишемического воздействия, а также механизмы, сопровождающие данное повреждение в сравнении с классической ишемией почки. Предлагаемая модель отличается простотой процедуры, возможностью варьировать локализацию поражения и низким риском сопутствующего повреждения. Благодаря низкой инвазивности модели и относительно небольшому размеру возникающего локуса ишемии в значительной степени предотвращаются страдания и чрезмерная гибель экспериментальных животных. Модель обеспечивает предсказуемое расположение очага и четкое разграничение между поврежденными и здоровыми тканями, что позволяет исследовать происходящие там процессы повреждения, регенерации, воспаления и фиброза. Четкий контур поврежденной ткани позволяет легко получать образцы ткани почки из поврежденных, перинфарктных и интактных участков одной и той же почки для различных «омиксных» исследований. Учитывая эти особенности фототромбоза почек, мы предполагаем, что эта модель будет полезна для тестирования нефропротекторных препаратов и изучения механизмов почечной недостаточности и восстановления после нее.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-30009.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. // Ann. Neurol.* 1985. 17: 497-504.
2. *Li H., Roy Choudhury G., Zhang N., Ding S. // J. Vis. Exp.* 2015. 101: e53161.
3. *Suvarna K.S., Layton C., Bancroft J.D.* Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-book. Elsevier Health Sciences. 2018.
4. *Schindelin J., Arganda-Carreeras I., Frise E. et al. // Nat. Methods.* 2012. 9(7): 676-82.
5. *Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E. et al. // J. Neurosci. Methods.* 2020. 329: 108457.
6. *Jankauskas S.S., Andrianova N.V., Alieva I.B. et al. // Biochemistry (Mosc).* 2016. 81(12): 1538-48.
7. *Hughes J., Gobe G. // Nephrology (Carlton).* 2007. 12(5): 452-8.
8. *Unsworth D.J., Scott D.L., Almond T.J. et al. // Br. J. Exp. Pathol.* 1982. 63(2): 154-66.
9. *Schrezenmeier E.V., Barasch J., Budde K. et al. // Acta Physiol (Oxf).* 2017. 219(3): 554-72.
10. *González-Magaña A., Blanco F.J. // Biomolecules.* 2020. 10(4): 570.

# НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ БАЛАНСЕ ЦИТОПЛАЗМЫ

*Погорелов А.Г., Панаит А.И., Станкевич А.А., Погорелова В.Н.*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Россия

**Введение.** При нормоксии энергообеспечение клеточных функций реализуется преимущественно через синтез АТФ в митохондриях. Блокируя указанный механизм, гипоксия индуцирует дезэнергизацию клетки, что может быть компенсировано гликолизом, который ускоряется в десятки раз в анаэробных условиях [1]. Этого достаточно, чтобы поддерживать основные функции клетки [2-4], но анаэробный гликолиз требует большого расхода глюкозы. Одновременно возникает клеточный ацидоз и меняется окислительно-восстановительный баланс цитоплазмы [5,6]. И это может стать причиной гидролиза полисахаридов, депонированных в клетке в виде гранул гликогена. Таким образом, гипоксия способна стимулировать не ферментативный способ получения глюкозы из эндогенного источника. Однако возможность реализации данного механизма требует дополнительных исследований. В настоящей работе изучали расщепление полисахаридов в воде на фоне изменения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Исследовали гидролиз зерен нерастворимого в воде крахмала, используя метастабильные фракции раствора с измененным значением ОВП и рН.

**Методы и объект исследования. Подготовка образцов.** Для моделирования условий с разными значениями окислительно-восстановительного баланса использовались метастабильные фракции электрохимически активированного водного раствора (ЭХАР), которые получали посредством проточного диафрагменного электролизера [7]. В среде окисленной фракции (анолит) регистрировали высокий уровень ОВП (+820 мВ) и относительно низкую величину рН (5.0). Наоборот, для восстановленной фракции (католит) характерны аномальную отрицательную величину ОВП (-800 мВ) и щелочное значение рН (10.5). Кислотность и ОВП водного раствора измеряли посредством рН-метра-иономера «Экотест-120» (НПП «ЭКОНИС», Россия). ОВП регистрировали при помощи платинового электрода ЭПВ-1, рН определяли ионселективным стеклянным электродом, для сравнения использовали хлорсеребряный электрод.

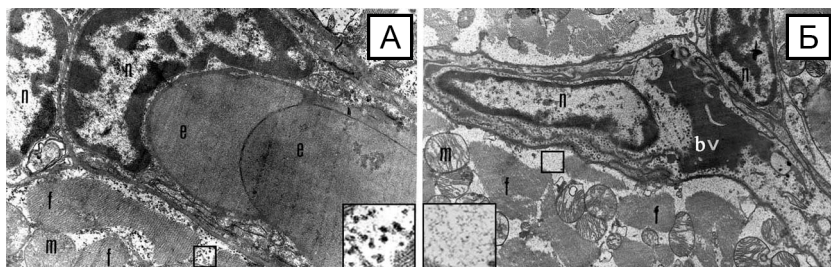
В настоящем исследовании проводили эксперименты *in vitro* в водной среде, содержащей полимеры глюкозы в форме растворимого в

воде модифицированного крахмала или нерастворимых зерен крахмала. На основе растворимой формы готовили маточный водный раствор (2.5% по весу), который затем в пропорции 1:4 разводили дистиллированной водой или одной из метастабильных водных фракций воды. Приготовленные растворы модифицированного крахмала анализировали методами UV-vis спектроскопии и времяпролетной масс-спектрометрии. Препараты нерастворимого в воде крахмала готовили следующим образом. К навеске крахмала (3 г) добавляли одинаковый объем (9 мл) дистиллированной воды или фракции ЭХАР. Приготовленные образцы нерастворимого крахмала 24 часа выдерживали при комнатной температуре, после чего частицы крахмала осаждали центрифугированием при 600 g в течение 15 мин. Отобранный супернатант разбавляли в пропорции 1:4 дистиллированной водой или одной из фракций ЭХАР и анализировали методами UV-vis спектроскопии. Поверхность зерен крахмала, обработанных дистиллированной водой, анолитом или католитом, исследовали посредством сканирующей электронной микроскопии.

**UV-vis спектроскопия.** Эффект ЭХАР на крахмал оценивали посредством сравнительного анализа спектров поглощения, используя спектрофотометр Shimadzu UV-2401PC (Япония). Для неспецифических спектров регистрировали оптическую плотность в ультрафиолетовой области. Дополнительно получали характерные спектры поглощения раствора олигосахаров в воде, используя иодитную реакцию, которую проводят при избытке йода в растворе, о чем свидетельствует наличие пика поглощения на длине волны 355 нм [8]. При гидролизе полисахаридов возможно образование фрагментов (декстрины, мальтоза, глюкоза) разного молекулярного веса. Растворы продуктов неполной диссоциации крахмала окрашиваются по-разному, например, для раствора амилозы характерно поглощение с максимумом в интервале 620-650 нм, а для амилопектина 520-580 нм.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Данный метод применили для визуализации поверхности нерастворимых в воде зерен крахмала. Обработанные зерна крахмала, осаждали центрифугирование, после чего удаляли супернатант, а осадок суспензировали в дистиллированной воде. Каплю (~2 мкл) взвеси частиц крахмала наносили на поверхность держателя образцов электронного микроскопа и сушили в потоке инертного газа (N<sub>2</sub>) при комнатной температуре. Затем в среде аргоновой плазмы на поверхность препарата напыляли слой платины, используя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Тонкую структуру рельефа изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме вторичных электронов.

**Результаты и их обсуждение.** Ферментативный гидролиз полимеров глюкозы в клетке включает два основных события. Растворимые в цитоплазме олигосахара диссоциируют до глюкозы при участии  $\alpha$ -амилазы. Этот водорастворимый пул по мере его истощения пополняется с помощью  $\beta$ -амилазы, которая отщепляет олигосахара от полисахаридов, депонированных в нерастворимых в воде гранулах гликогена. Наглядным примером результата гидролиза, протекающего в клетке, служит изменение ультраструктуры в кардиомиоците (рис. 1), обусловленное действием длительной функциональной ишемии [9].



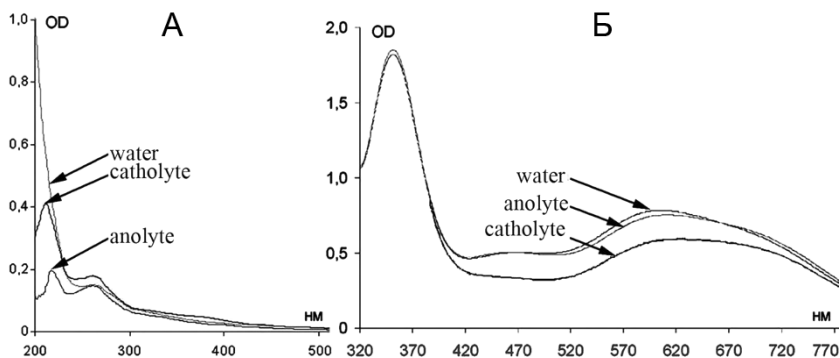
**Рис. 1.** Изображение ультраструктуры папиллярной мышцы сердца крысы в области капилляра крови. Микрофотографии получены посредством просвечивающей электронной микроскопии: (А) препарат мышцы сердца контрольного животного, (Б) препарат мышцы сердца животного при ишемии. Обозначения: bv – капилляр крови, n – ядро эндотелиальной клетки, e – эритроцит, f – мио фибрилла, m – митохондрия. Вставка – область цитоплазмы мышечной клетки сердца, содержащей гранулы гликогена. (Из: Pogorelov et al., 2022 [10]).

Сравнение морфологии (см. рис. 1) папиллярной мышцы сердца крысы показывает характерное для ишемии нарушение, когда возникает спазм, обусловленный уменьшением просвета капилляра. Такая реакция эндотелия блокирует одновременно поступление в кардиомиоцит экзогенной глюкозы и кислорода, что вызывает нарастающую деэнергизацию клетки. На этом фоне наблюдается качественное изменение в области цитоплазмы (см. рис. 1, вставки), когда увеличивается количество гликогенных гранул, но их размер уменьшается, что делает более эффективным поверхностный гидролиз. В рассматриваемой ситуации, учитывая изменение redox баланса, индуцированное ишемическим ацидозом и накоплением активных форм кислорода, нельзя исключать вклад неферментативного пути гидролиза олигосахаров и гликогена.





свидетельствует о расщеплении крупных молекул олигосахаров на фрагменты, которые окрашиваются йодом и, следовательно, дают дополнительную оптическую плотность. Таким образом, для окисленной фракции воды, по-видимому, характерна псевдо ферментативная активность по типу  $\beta$ -амилазы. На основе анализа UV-vis спектров поглощения можно утверждать, что гидролиз олигосахаров происходит в обеих метастабильных фракциях воды, но по разному механизму. При этом меняется молекулярный состав анализируемых растворов, что подтверждено посредством метода TOF-SIMS [10]. **Спектрометрия водных экстрактов из гранул крахмала.** В отсутствие экзогенного притока глюкозы уменьшение в цитоплазме концентрации олигосахаров компенсируется за счет гидролиза не растворимых в воде полисахаридов, хранящихся во внутриклеточном депо. Возможность не ферментативного гидролиза такой формы полимера глюкозы в ЭХАР исследовали *in vitro*. Спектры поглощения водных растворов олигосахаров, экстрагированных из гранул крахмала в дистиллированную воду, анолит или католит, показаны на рис. 3.



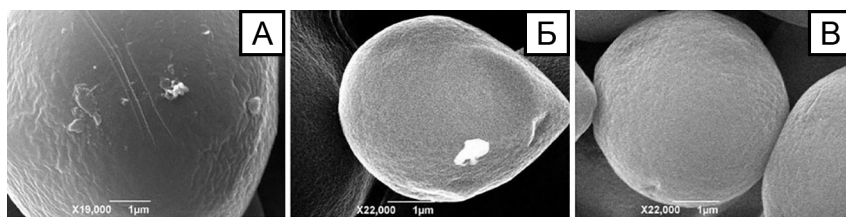
**Рис. 3.** Спектры поглощения экстракта, полученного при выдерживании гранул нерастворимого в воде крахмала в дистиллированной воде, католите или анолите: (А) неспецифические спектры поглощения в UV области, (Б) характерные спектры поглощения с максимум, полученные после окраски водного экстракта посредством иодитной реакции.

Рассмотрение неспецифичных UV спектров поглощения экстрактов (рис. 3А) показывает, что обе фракции воды с измененным редок балансом влияют на экстракт олигосахаров похожим образом, значительно уменьшая его оптическую плотность. Если сравнивать с характерными спектрами поглощения растворов модифицированного крахмала (рис. 2Б), то для спектров экстрактов (рис. 3Б) наблюдается сдвиг максимума в

область 610 нм, что отражает различие в составе олигосахаров. Причина, возможно, заключается в разных исходных мишенях для гидролиза, когда в водной среде растворимого крахмала преобладают олигосахара, а в среде, содержащей гранулы крахмала, нерастворимые полисахариды.

Из анализа характерных спектров поглощения (рис. 3Б) видно, что уровень олигосахаров в экстракте католита значительно ниже, чем в экстрактах воды или анолита. Интерпретация этого результата не столь однозначна, как в случае растворимого в воде крахмала, так как может означать не только высокую амилолитическую активность, но и более медленный гидролиз католитом полисахаридов, депонированных в гранах крахмала. Чтобы исключить этот фактор, сравнивали содержание веществ в водных экстрактах посредством микро взвешивания сухого остатка в капле раствора [10]. Полученные данные не показали значимого различия между пробами экстракта, полученного при выдерживании зерен нерастворимого крахмала в дистиллированной воде, анолите или католите. Другими словами, уменьшение оптической плотности для экстракта католита (рис. 3Б) не обусловлено относительно низкой экстрагирующей способностью электрохимически восстановленной фракции дистиллированной воды.

Таким образом, на основе анализа UV-vis спектров поглощения можно утверждать, что изменение окислительно-восстановительного баланса водной среды обеспечивает гидролиз нерастворимых полисахаридов и влияет на состав растворимых олигосахаров. Учитывая амилолитический эффект воды с измененным окислительно-восстановительным балансом, можно ожидать изменение тонкого рельефа поверхности зерен крахмала. Данное предположение исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 4).



**Рис. 4.** Микрофотографии, полученные методом сканирующей электронной микроскопии (режим вторичных электронов). Изображение рельефа поверхности зерен не растворимого в воде крахмала: (А) после обработки дистиллированной водой, (Б) после обработки анолитом, (В) после обработки католитом.

Из сравнения микрофотографий (рис. 4) видно, что для поверхности зерен нерастворимого крахмала, обработанных дистиллированной водой, характерен более грубый рельеф. Результаты ультраструктурного анализа

визуально демонстрируют эффект травления, обусловленный гидролизом полисахаридов на поверхности гранул крахмала. Отметим, что в данной работе использовали гранулы, размер которых превышал несколько микрометров. Эффект поверхностного гидролиза, возможно, будет более выраженным для наноразмерных частиц крахмала, что соответствует ситуации в клетке.

**Заключение.** Завершая обсуждение результатов, можно прийти к следующему выводу. Полимеры глюкозы как в форме растворимых в воде олигосахаров, так и нерастворимых полисахаридов гидролизуются в водной среде с измененным окислительно-восстановительным балансом. Для восстановленной фракции воды свойственна псевдо ферментативная активность по типу  $\alpha$ -амилазы, а для окисленной фракции по типу  $\beta$ -амилазы. Амилолитическая активность приводит к экстракции из нерастворимых в воде гранул крахмала, в которых депонированы полисахариды, олигосахаров с последующей их диссоциацией. Полученные результаты позволяют предположить наличие в клетке неферментативного гидролиза полимера глюкозы, обусловленного локальным изменением во времени и пространстве отдельного компартмента клетки. При гипоксии в отсутствие экзогенного поступления данный механизм может быть использован для поддержания внутриклеточного уровня глюкозы – субстрата, необходимого для интенсивного анаэробного гликолиза.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019-П).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kubler W., Spieckermann P.G. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1970. 1: 351-77.
2. Reimer K.A., Jennings R.B., Tatum A.H. // Am. J. Cardiol. 1983. 52: 72A-81A.
3. Allen D.G., Orchard C.H. // Circ. Res. 1987. 60: 153-68.
4. Dizon J., Burkhoff D., Tauskela J. et al. // Am. J. Physiol. 1998. 274: H1082-9.
5. Droge W. // Physiol. Rev. 2002. 82: 47-95.
6. Valko M., Leibfritz D., Moncola J. et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2007. 394: 44-84.
7. Bakhir VM, Pogorelov AG. // Int. J. Pharm. Res. Applied Sci. 2018. 7(1): 41-57.
8. Иванов Н.Н. // Методы физиологии и биохимии растений. Сельхозгиз. М., 1946.
9. Pogorelov A., Allachverdov B., Burovina I. et al. // J. Microscopy. 1991. 12: 255-69.
10. Pogorelov A.G., Gulina A.A., Pogorelova V.N. et al. // Phys. Wave Phenom. 2022. 3(3): 209-16.
11. Petrushanko I.Yu., Lobyshev V.I. // Biophysics. 2004. 49(1): 17-26.
12. Shirahata S., Hamasaki T., Teruya K. // Trends Food Sci. Technol. 2012. 23: 124-13.
13. Henry M., Chambron J. // Water. 2013. 5: 2094-115.

# АЛГОРИТМ ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПОСЛЕ ВЫЗВАННОЙ ИШЕМИИ ПОСРЕДСТВОМ ОКРАСКИ ТТС

Сариев А.У.<sup>1</sup>, Баев А.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Центр Передовых Технологий, Ташкент, Узбекистан

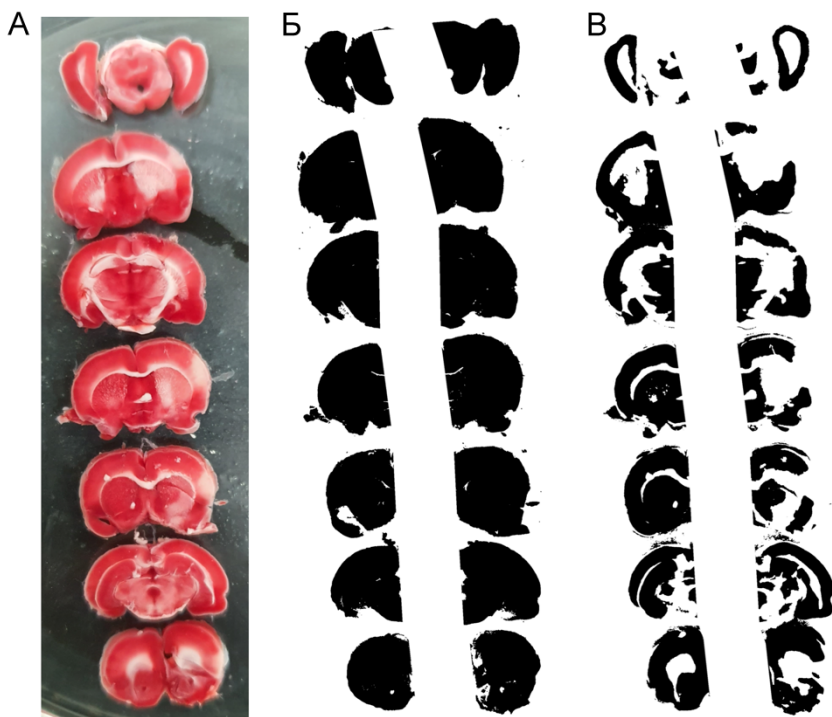
<sup>2</sup>Национальный Университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

**Введение.** Несмотря на распространённость и высокий уровень инвалидизации после ишемического инсульта очень мало действующих методов для борьбы с данной болезнью [1]. Большое количество средств, показавших свою эффективность в условиях *in vitro* и *in vivo* проваливаются на стадии клинических испытаний [2]. Одной из причин этому может быть широкий разброс методик оценки результатов и как следствие низкая воспроизводимость экспериментов. Это свидетельствует о необходимости улучшения стандартов и оптимизации методов исследования ишемии *in vitro* и *in vivo*. Основным методом оценки клеточной смерти после вызванного ишемического инсульта у лабораторных животных является окрашивание с помощью красителя ТТС (2,3,5-трифенилтетразолий гидрохлорид) [3]. В митохондриях, ТТС принимает электроны и восстанавливается до липидорастворимого фармазана красного цвета, что является гистохимическим индикатором митохондриальных окислительных ферментов. Отсутствие красного окрашивания считается признаком клеточной смерти. Для оценки степени клеточной смерти после вызванной ишемии площадь неокрашенных участков в мозговых срезах отмечается вручную в компьютерной программе обработки цифровых изображений. Ручное выделение требует большого количества времени и имеет высокую вариабельность из-за различных критериев разграничения неокрашенных частей мозга. В данном исследовании мы предлагаем алгоритм для оптимизации и автоматизации оценки уровня клеточной смерти после вызванного ишемического инсульта в мозге крыс.

**Методы.** Ишемический инсульт у крыс вызывался окклюзией средней мозговой артерии методом *Longa* [4]. Мозг после выделения нарезался на равные срезы с помощью специальной матрицы для резки мозга. Получившиеся срезы опускали в 0.2% раствор ТТС и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После окрашенные срезы оцифровали с помощью сканера или фотоаппарата с темным фоном. Для анализа изображений использовали бесплатную программу ImageJ [5].

**Результаты.** Алгоритм определения площади инфаркта использует параметры яркость для выделения всей поверхности мозга и насыщенности для выделения окрашенных частей срезов. Для анализа изображения в первую очередь нужно вырезать часть фотографии только

со срезами и задать масштаб (рис. 1А). Далее нужно разделить данное изображения на две части по срединной линии полушарий мозга полигональным инструментом селекции. Потом изображения необходимо разделить (HSB stack) на компоненты «Оттенка» (Hue), «Яркости» (Brightness) и «Насыщенности» (Saturation). Выставив пороговое значение «Яркости» автоматически или вручную можно выделить всю площадь мозговых срезов (рис. 1Б). Далее с помощью порогового значения «Насыщенности» выделяется и вычисляется площадь только покрашенной части мозга (рис. 1В). Так как инфаркт определяется по не покрашенной площади пораженного полушария, от площади покрашенной части контралатерального полушария вычитается площадь покрашенной части ипсилатерального полушария (рис. 2).



**Рис. 1.** Результаты обработки алгоритмом выделения общей и окрашенной поверхности. А. Срезы мозга после вызванной ишемии, окрашенные методом ТТС. Б. Выделение общей площади мозговых срезов с помощью алгоритма. В. Выделение только окрашенной части мозговых срезов с помощью алгоритма.

$$UnS\_IHA = \sum_i^n IHA_i - \sum_i^n S\_IHA_i \qquad UnS\_CHA = \sum_i^n CHA_i - \sum_i^n S\_CHA_i$$

$$Infarct \% = 100\% * \frac{UnS\_IHA - UnS\_CHA}{\sum_i^n CHA_i} \qquad Edema = \frac{\sum_i^n IHA_i - \sum_i^n CHA_i}{\sum_i^n CHA_i}$$

**Рис. 2.** Формулы, использованные в алгоритме для вычисления площади инфаркта и отека. IHA – площадь ипсилатерального полушария, CHA – площадь контралатерального полушария. S\_IHA и S\_CHA – прокрашенные участки мозга. UnS\_IHA и UnS\_CHA – не прокрашенные участки мозга. Infarct % – процент пораженной площади. Edema – отек пораженного полушария мозга.

Для автоматизации процесса обработки алгоритм был прописан в виде запускаемого скрипта. Данный алгоритм позволяет стандартизировать и уменьшить время обработки изображений для оценки клеточной смерти на срезах мозга. Зачастую ручной метод ошибочно учитывает части мозга, которые не прокрашиваются методом ТТС из-за низкого содержания митохондрий и не учитывает вклад отека мозга в общий объем тканей мозга. Предложенный нами метод избегая вышеуказанные ошибки дает более достоверный результат.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Kolominsky-Rabas P.L. et al. // Stroke. 2001. 32(12): 2735-40.*
2. *Ghozy S. et al. // Front. Neurol. 2022. 13: 870141.*
3. *Sommer C. // Histology and Infarct Volume Determination in Rodent Models of Stroke in Rodent Models of Stroke. Dirnagl U. (eds). 2016. Springer, NY: 263-77.*
4. *Longa E.Z. et al. // Stroke. 1989. 20(1): 84-91.*
5. *Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. // Nat. Methods. 2012. 9(7): 671-5.*

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ 2-(ХЛОРДИНИТРОМЕТИЛ)-4-МЕТОКСИ-6-(4-МЕТИЛПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-1,3,5-ТРИАЗИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*Сизова А.И., Ильясов П.В., Бозуш В.В., Лимарева Л.В.*

Научно-образовательный профессиональный центр генетических и лабораторных технологий, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

**Введение.** Изучение токсичности и безопасности новых биологически активных молекул является одним из необходимых этапов их доклинического изучения. Применение культур клеток человека при

оценке безопасности новых веществ позволяет уменьшить эксперименты на животных при поиске и разработке новых препаратов, повышает надежность полученных данных при их экстраполяции на организм человека.

Наиболее распространённым методом определения цитотоксичности вновь синтезированных соединений является МТТ-тест, отличающийся высокой быстротой получения результата, хорошей воспроизводимостью и относительной дешевизной. Кроме того, протокол проведения МТТ-теста можно модифицировать в зависимости от целей исследования [1,2].

Вместе с тем, общеизвестно, что почти любой процесс окисления и утилизации органических веществ в живых клетках в конечном итоге замыкается на компонентах электрон-транспортной дыхательной цепи. Это приводит к поглощению кислорода клетками из окружающей среды, уровень которого пропорционален метаболической активности клеток и зависит как от используемого субстрата, так и от состояния клеток и наличия в них тех или иных ферментов. Очевидно, что клетки различных организмов или тканей, а также клетки, подвергавшиеся или не подвергавшиеся какому-либо значимому воздействию, будут характеризоваться качественными и количественными различиями активности в отношении набора определенных субстратов. Следовательно, поглощение кислорода при разложении и трансформации определенных субстратов клетками также можно использовать для оценки биохимических особенностей этих клеток и их состояния в целом. Так, в 2006 г. компания Agilent разработала анализатор Seahorse XF, использующий измерение потребления кислорода и выделения рН-активных продуктов для исследования различных аспектов функционирования клеток, в том числе для тестирования потенциальных фармакологических препаратов [3].

В данной работе предпринято исследование возможности использования подхода, основанного на применении кислородного электрода Кларка с иммобилизованными лимфоцитами человека, для оценки цитотоксичности потенциальных фармпрепаратов. Такое устройство может осуществлять измерение концентрации растворенного кислорода в непосредственном окружении живых интактных клеток, что обеспечивает оценку их физиологического состояния, а также определять их чувствительность к действию тестируемых соединений. Подобный подход является частичным аналогом метода, реализуемого в Agilent Seahorse XF, и может составлять основу персонализированной оценки переносимости лекарственных препаратов пациентами.

**Материалы и методы.** Работа была выполнена на базе Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий (НОПЦ ГЛТ) ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. В качестве тестируемого соединения использовали 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин (2-

ХММТ), синтезированный в Самарском государственном техническом университете. Соединения этого типа известны как пролекарства, которые для проявления своей противоопухолевой активности должны пройти ряд метаболических превращений в организме, в результате которых образуются алкилирующие агенты [4].

Образцы цельной венозной крови разводили в соотношении 1:1, выделяли лимфоциты (мононуклеарные клетки) методом наслаивания на градиент плотности фиколла ( $\rho = 1.077$ , ООО НПП «ПанЭко», Россия) [5], оценивали жизнеспособность лимфоцитов методом подсчёта в камере Горяева, после чего инкубировали их в питательной среде 199 с L-глутамином (Биолот, РФ) и 10% сывороткой эмбрионов КРС (Биолот, РФ) в 96-луночных планшетах (Медполимер, РФ) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов в присутствии и в отсутствие фитогемагглютинаина (ФГА) в концентрации 200 мкг/мл (Sigma, Германия).

Лимфоциты человека, выделенные центрифугированием в градиенте фиколла, наносили на хроматографическую стеклобумагу GF/A (Whatman, Великобритания) из расчета порядка 2-3 миллионов клеток на одно нанесение. Фрагмент стеклобумаги с клетками помещали на рабочую область кислородного электрода Кларка ДКТП-02.4, подключенного к анализатору «Эксперт-001» (ООО Эконикс-Эксперт, РФ), и механически фиксировали с помощью капроновой сетки и прижимного кольца. Электрод с клетками помещали в кювету, содержащую 2 мл рабочей среды (физиологический раствор с фосфатным буфером, pH 7.6). В качестве субстратов использовали растворы ряда соединений в конечной концентрации 50 мМ. Для оценки токсического воздействия добавляли растворы тестируемого соединения. В качестве измеряемого параметра сигнала использовали максимальную скорость изменения концентрации кислорода (мг O<sub>2</sub>/л с). Каждое измерение в ходе экспериментов выполняли в трех повторностях.

В качестве метода сравнения для оценки токсичности исследуемых соединений использовали МТТ-тест. Для этого в лунки с ФГА и без ФГА вносили тестируемое соединение в концентрациях 50 мкМ, 10 мкМ и 5 мкМ и инкубировали в течение 70 ч, после чего выполняли МТТ-тест по стандартной методике.

Статистическую обработку результата проводили с использованием Microsoft Office Excel 2016 с надстройкой Attestat 12.5 (И.П. Гайдышев, РФ).

**Результаты.** Скорость снижения концентрации растворенного кислорода при измерениях респираторной активности лимфоцитов была пропорциональна концентрации субстрата, однако отличалась для различных субстратов, вводимых в одинаковых концентрациях. Среди протестированных субстратов лимфоциты обладали наибольшей активностью по отношению к органическим кислотам, причем максимальная активность продемонстрирована в отношении



глицерофосфата натрия. Этот субстрат использовали в дальнейших экспериментах в качестве контрольного для учета остаточной метаболической активности лимфоцитов.

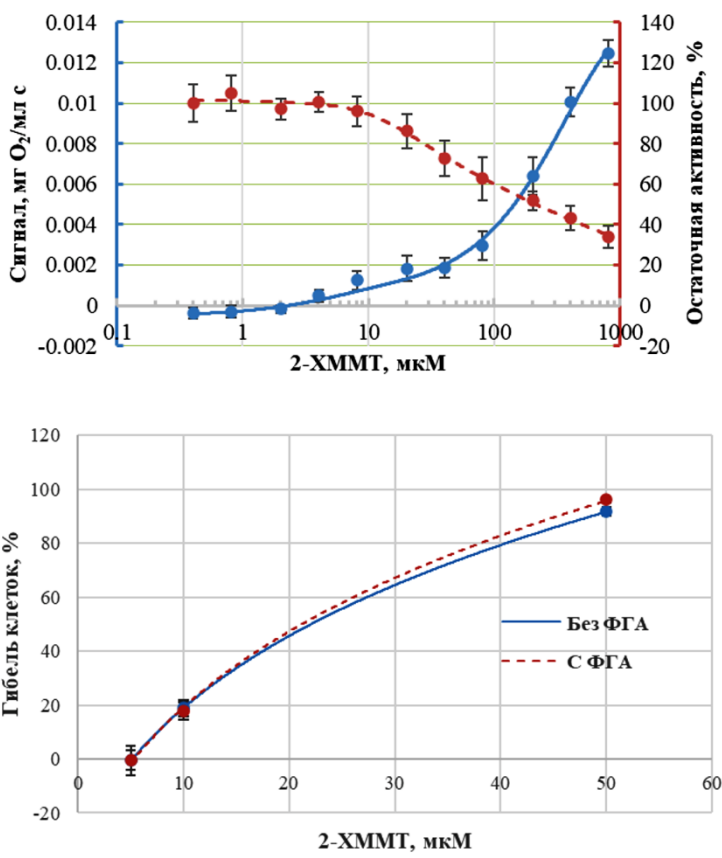


Рис. 1. Графики эффекта 2-ХММТ в зависимости от его концентрации.

На рисунке приведены графики оценки действия 2-ХММТ на лимфоциты с помощью кислородного электрода (слева) и в ходе МТТ-теста (справа). Для МТТ-теста показаны зависимости токсического эффекта для лимфоцитов, подвергавшихся или не подвергавшихся воздействию ФГА. Для кислородного электрода приведены графики величины непосредственной токсической реакции лимфоцитов (сплошная линия) и их остаточной активности (пунктирная линия). За остаточную активность принимали величину реакции клеток на глицерофосфат натрия, вводимый после регистрации токсического ответа на

соответствующую концентрацию 2-ХММТ и промывки электрода с клетками, в процентах от такой же реакции в начале эксперимента (до введения минимальной концентрации токсического соединения). Соответственно, реакция лимфоцитов на глицерофосфат в начале эксперимента принята за 100%.

Графики демонстрируют крайне незначительное влияние ФГА на восприимчивость лимфоцитов к действию 2-ХММТ, которое становится значимым только в области высоких концентраций триазина. Метод на основе электрода Кларка позволил выявить постепенное увеличение токсического ответа лимфоцитов и снижение остаточной активности с ростом концентрации тестируемого соединения. На основании этих зависимостей были определены пороговые концентрации 2-ХММТ как в отношении непосредственной реакции клеток на воздействие соединений, так и в отношении остаточной активности клеток после такого воздействия, а также значения  $IC_{50}$  для МТТ-теста. Под пороговой концентрацией подразумевается наименьшая концентрация, при которой соответствующая реакция клеток (токсический эффект или остаточная активность) значимо отличается от исходного значения. Для оценки статистической значимости различия значений реакции клеток использовали критерий Манна-Уитни. Значения пороговых концентраций, найденные при регистрации активности клеток с помощью электрода Кларка и при оценке цитотоксического действия посредством МТТ-теста, приведены в таблице.

**Табл. 1.** Значения пороговых концентраций токсического действия 2-ХММТ, мкМ.

	Электрод Кларка		МТТ-тест	
	Токсический эффект	Остаточная активность	Токсический эффект	$IC_{50}$
Без ФГА	4.0±0.4	22.9±2.8	8.1±0.1	22.1±2.0
С ФГА			8.2±0.1	21.2±2.4

Из таблицы видно, что пороговые значения, полученные для токсического эффекта с помощью электрода Кларка и с помощью МТТ-теста, а также значения остаточной активности для метода на основе электрода Кларка и  $IC_{50}$  для МТТ-теста, достаточно близки друг к другу, хотя и не совпадают полностью. Вероятно, это несоответствие обусловлено различиями данных методов. Тем не менее, полученные результаты указывают на допустимость применения использованного метода для анализа цитотоксичности, а отсутствие необходимости инкубирования и возможность многократного использования клеток делают его в ряде случаев более предпочтительным по сравнению с МТТ-тестом и другими традиционными методами анализа цитотоксичности. При этом метод, использованный в данной работе, позволяет выполнять подобный анализ для лимфоцитов, выделенных от конкретного пациента, что открывает возможность выполнить персонализированную оценку переносимости

препаратов до их фактического введения пациенту и избежать потенциальных побочных эффектов терапии.

**Заключение.** В ходе исследования метод оценки метаболической активности клеток использовали для отслеживания реакции лимфоцитов периферической крови на субстраты и токсические соединения. Этот метод обеспечил выполнение анализа цитотоксического действия потенциальных противоопухолевых агентов, что позволило определить их пороговые токсические концентрации для лимфоцитов периферической крови человека. Показано, что полученные пороговые концентрации согласуются с данными эталонного метода – МТТ-теста цитотоксичности. Полученные результаты имеют значение для разработки методов испытаний потенциальных лекарственных средств, а также для персонализации терапии в части прогнозирования эффективности и переносимости препаратов до их фактического введения пациенту.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др.* // В Хабриев Р.У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Медицина. 2005: 637-74.
2. *Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Золотова Е.А. и др.* // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2020. 1: 58-61.
3. Agilent Technologies Inc. How Agilent Seahorse XF Analyzers Work|Agilent. Accessed 23.03.2023, <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work>
4. *Gidaspov A.A., Bakharev V.V., Kachanovskaya E.V. et al.* // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2004. 38(8): 411-9.
5. *Коленчукова О.А., Сарматова Н.И.* // Антибиотики и химиотерапия. 2014. 59(11-12): 20-3.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ СКОРОСТИ АТФ-ПОТРЕБЛЯЮЩИХ РЕАКЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА АТЕАМ

*Третьяков Д.О.<sup>1,2</sup>, Лапашина А.С.<sup>1,2</sup>, Фенюк Б.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) – это основная энергетическая молекула в живых системах. Она играет важное значение в большом количестве клеточных процессов, таких как клеточный сигналинг, синтез ДНК, РНК и белков, мембранный транспорт и многие

другие. Всё это - АТФ-потребляющие реакции, но их исследование *in vitro* осложнено из-за ограничений имеющихся методов: например, невозможно измерение при физиологических значениях концентрации фосфата (десятки мМ) и АДФ (мМ), многие методы имеют узкий рабочий диапазон рН. Мы вынуждены делать выбор между прямой детекцией изменений концентрации АТФ в реальном времени, но без возможности широко варьировать условия, и измерением скорости реакций путем определения количества реактантов через определенные интервалы времени (по точкам). Для измерений концентрации АТФ *in vivo* одним из решений оказалось использование белковых флуоресцентных зондов [1]. Подобные сенсоры обратимо связывают АТФ, что приводит к изменению их конформации и, соответственно, флуоресцентного ответа. Мы предположили, что эти зонды могли бы применяться для количественных измерений концентрации АТФ *in vitro*. Данная работа представляет собой разработку и оптимизацию метода регистрации изменений концентрации АТФ в реальном времени, позволяющего детектировать скорость реакции на фоне высоких концентраций фосфата и АДФ, в широком диапазоне рН с помощью зонда АTeam. Разработанный нами метод был успешно применен для исследования АТФ-потребляющих ферментативных реакций.

**Материалы и методы. Экспрессия и очистка АTeam.** Для постановки метода был выбран зонд АТ1.03-УЕМК, имеющий  $K_d(\text{АТФ}) = 1.2 \text{ мМ}$  при  $37^\circ\text{C}$ . Кодированная последовательность зонда находится в составе вектора рRSET, которым трансформировалась бактериальная культура. Затем бактерии выращивались в 3 л среды LB при  $37^\circ\text{C}$ , осаждались центрифугированием, разрушались с помощью френч-пресса и зонд очищался из клеточного лизата с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе как описано в [1].

**Измерение спектров и динамики.** Для детекции ответа зонда снимаются либо спектры испускания, либо интенсивность одной волны или обеих волн, соответствующая пикам на подобном спектре. Возбуждение происходит на длине волны 435 нм, спектр испускания имеет два пика, 480 нм и 530 нм. При увеличении концентрации АТФ левый пик уменьшается, а правый растет, поскольку правый пик соответствует испусканию YFP, который возбуждается за счет FRET. Данный принцип работы зонда можно увидеть на рисунке 1.

В качестве АТФазы использовали  $F_1$ -субкомплекс АТФ-синтазы *E. coli*, обладающий АТФазной активностью. Для проверки работоспособности метода параллельно с измерением реакции за счет АTeam она детектировалась другими методами:

Количество образующегося в ходе реакций АДФ измеряли напрямую в АТФ-регенерирующей системе как в работе [2].

Выделяющийся при реакции гидролиза фосфат измерялся за счет колориметрической реакции с молибдатом [3].

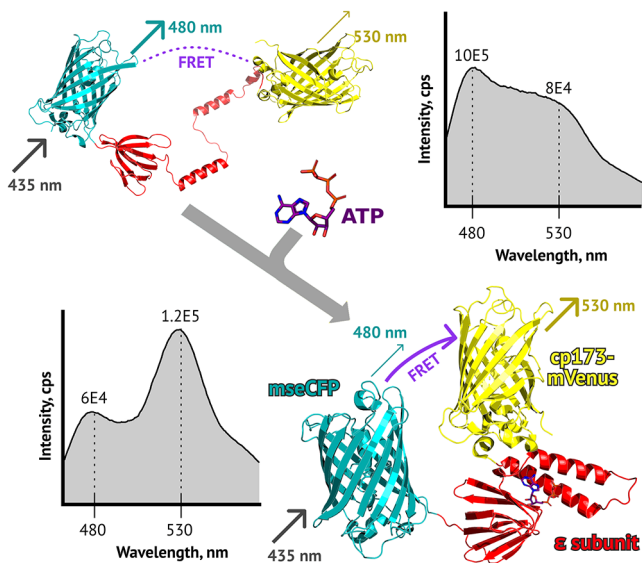


Рис. 1. Принцип работы зонда.

**Проверка работоспособности метода.** С помощью АTeam в реальном времени наблюдали за двумя реакциями:

АТФ-Mg + глюкоза → глюкозо-6-фосфат + АДФ-Mg  
 – (в присутствии гексокиназы);

АТФ-Mg → АДФ-Mg + P<sub>i</sub>  
 – (в присутствии АТФазы)

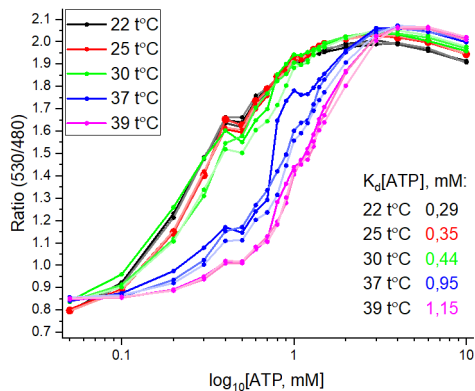
**Результаты. Характеристика зонда.** Зависимость флуоресцентного сигнала АTeam, а также интенсивности испускания правого пика от концентрации АТФ описывается уравнением Хилла:

$$R = \frac{(R_{max} - R_{min}) * [S]^n}{[S]^n + K_d^n} + R_{min}$$

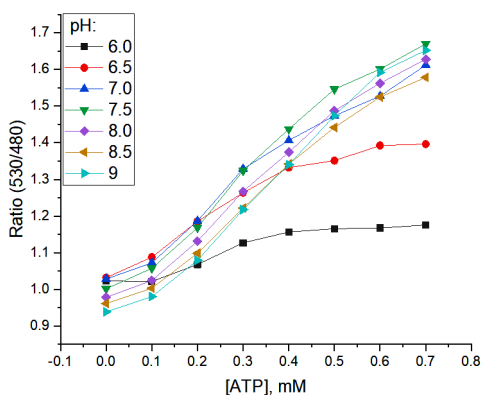
где R<sub>max</sub> и R<sub>min</sub> – это максимум и минимум флуоресцентного сигнала, соответственно, K<sub>d</sub> – кажущаяся константа диссоциации, n - коэффициент Хилла.

Была выработана методика измерения реакций за счет АTeam. Так, аппроксимация уравнением Хилла всей кривой зависимости сигнала от АТФ без фиксации параметров и даже линейная аппроксимация части кривой вблизи точки перегиба хорошо описывают наблюдаемые данные.

Исследована зависимость сигнала зонда от концентрации АТФ при разных температурах. Путем аппроксимации полученных кривых уравнением Хилла были получены  $K_d$  для каждой температуры. Как можно видеть из рисунка 2, они равномерно растут примерно на 1 порядок при увеличении температуры на 20°C.

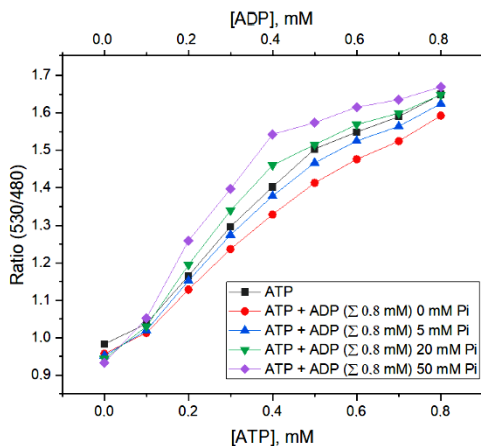


**Рис. 2.** Зависимость сигнала АTeam от концентрации АТФ при разных температурах.



**Рис. 3.** Влияние pH на зависимость сигнала АTeam от концентрации АТФ.

Исследовано влияние рН на зависимость сигнала АТем от концентрации АТФ (рис. 3). В интервале рН от 7.5 до 9 зависимости сигнала зонда от концентрации АТФ оказались схожими. Зависимость при рН 7 показывает некоторое снижение чувствительности, а дальнейшее уменьшение рН продолжает данный тренд. При этом при рН 7; 6.5; 6 зависимость все еще можно использовать для перевода сигнала в концентрацию АТФ, но амплитуда ответа зонда падает вплоть до двух раз при рН 6.



**Рис. 4.** Влияние АДФ и фосфата на зависимость сигнала АТем от концентрации АТФ.

Исследовано влияние АДФ и фосфата (рис. 4) на зависимость сигнала АТем от концентрации АТФ. Увеличение фоновой концентрации фосфата увеличивает чувствительность зонда к АТФ. При высоких концентрациях фосфата (50 мМ) зависимость начинает менять свою форму и правое плато начинается раньше. Это означает, что при высоких концентрациях фосфата диапазон для линейной аппроксимации уменьшается. АДФ несколько снижает амплитуду ответа зонда.

Оценена скорость связывания и диссоциации АТФ с зондом (рис. 5). Связывание зонда с АТФ происходит заметно медленнее, чем диссоциация. Это налагает определенные ограничения на возможности измерения как синтеза, так и гидролиза АТФ.

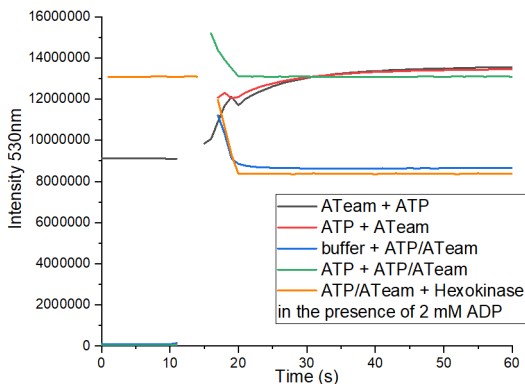


Рис. 5. Уравновешивание зонда с АТФ.

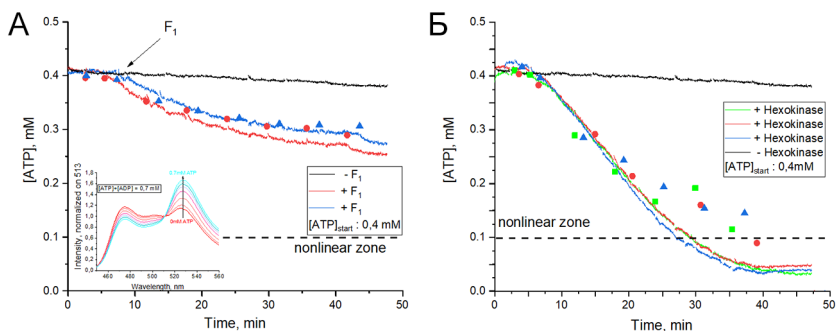


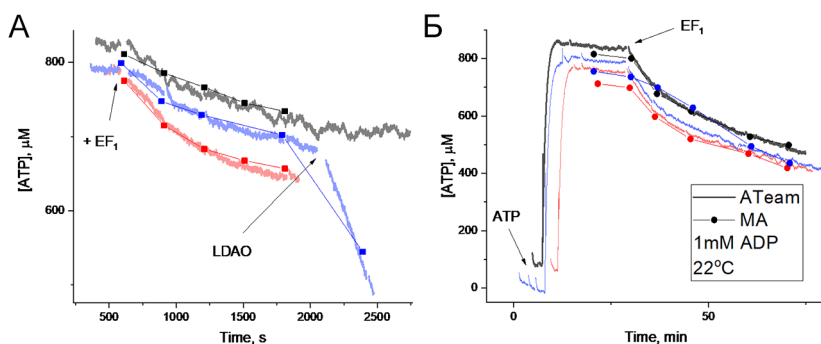
Рис. 6. Измерения реакций гидролиза АТФ-АТФазой (А) и гексокиназной реакции (Б). Кинетика падения концентрации АТФ, рассчитанной по интенсивности испускания YFP показана в виде сплошных кривых. Вычисленные с помощью АТФ-регенерирующей системы концентрации АТФ в отдельные моменты времени приведены в виде точек. Линия пунктира ограничивает под собой зону нелинейного ответа зонда. Черная кривая на каждой картинке записана в отсутствии АТФ-потребляющего фермента. Встроенный в рисунок А график демонстрирует вид необработанных спектральных данных, использовавшихся в этом эксперименте для пересчета интенсивности испускания YFP в концентрацию АТФ.

**Методика измерения и проверка работоспособности метода.**

Для перевода сигнала зонда в концентрацию АТФ строится калибровочная кривая. Это делается строго в тех же условиях, что и измеряемые реакции. На рис. 6 представлены результаты измерения с помощью зонда АТем



двух реакций, сопряженных с затратой АТФ: гидролиза АТФ  $F_1$ -АТФазой и АТФ-зависимое фосфорилирование глюкозы гексокиназой. Точками в обоих экспериментах обозначены концентрации АТФ в кювете, определенные в отобранных из образца аликвотах с помощью АТФ-регенерирующей системы. Как можно видеть из рисунка 6, измерения с помощью АТФ-регенерирующей системы и зонда АТteam (сплошные кривые) дали сходные результаты. Измерение изменений концентрации АТФ с помощью АТteam позволяет проводить измерение АТФазной активности ферментов при высоких значениях концентрации свободного фосфата (25 мМ) и АДФ (1-2 мМ), моделирующих условия в клетках при голодании. В таких условиях была измерена АТФазная активность  $F_1$ -АТФазы из кишечной палочки, постановка экспериментов аналогична представленным на рисунке 6, одна при высоких АДФ использовался колориметрический метод определения выделившегося фосфата.



**Рис. 7.** Измерения реакций гидролиза  $F_1$ -АТФазой при высокой концентрации в среде измерения фосфата (25 мМ) (А) или АДФ (1 мМ) (Б). Лаурилдиметилксид (ЛДАО) – стимулятор АТФазной активности  $F_1$  [4].

Данные эксперименты демонстрируют, что измерения с помощью зонда АТteam соответствует результатам измерений с использованием классических методов и количественно и кинетически. Применимость метода доказана для измерения гидролиза АТФ в реальном времени в присутствии миллимолярных концентраций АДФ, а также неорганического фосфата в диапазоне десятков мМ. Учитывая это, а также совокупность вышеизложенных экспериментов и фактов, можно говорить о том, что метод валидирован и может применяться для отслеживания изменений концентрации АТФ *in vitro* в реальном времени.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-14-00268).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Imamura H., Nhat K.P.H., Togawa H. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. 106: 15651-6.
2. *Feniouk B.A., Suzuki T., Yoshida M.* // J. Biol. Chem. 2007. 282: 764-72.
3. *Nishimura M., Ito T., Chance B.* // Biochim. Biophys. Acta. 1962. 59: 177-82.
4. *Lapashina A.S., Feniouk B.A.* // Biochemistry . 2018. 83: 1141-060.

## ПРИМЕНЕНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ

*Чечехина Е.С., Волошин Н.С., Тюрин-Кузьмин П.А.*

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет  
фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

Искусственный интеллект (ИИ) – это область компьютерных наук, которая занимается созданием программ и устройств, способных имитировать интеллектуальные функции человека, такие как обучение, решение задач, анализ данных, распознавание образов, общение с людьми и т.д. Наряду с другими направлениями применения, ИИ становится все более важным инструментом в области анализа биологической информации. Обладая способностью быстро и точно анализировать огромные объемы данных, ИИ может помочь исследователям выявлять важные и неочевидные на первый взгляд закономерности, принимать более обоснованные и непредвзятые решения.

Существует несколько основных типов ИИ, используемых для анализа биологических данных:

**1. Алгоритмы глубокого обучения: CNN, RNN и GAN.** Глубокое обучение является одним из подходов в области искусственного интеллекта. Главное отличие глубокого обучения от других методов машинного обучения заключается в том, что оно может автоматически извлекать признаки из данных, не требуя их явного определения. Его алгоритмы основаны на имитации работы человеческого мозга. Они используют нейронные сети, состоящие из многих слоев, для обработки и анализа данных. Каждый слой принимает входные данные, выполняет некоторые математические операции над ними и передает результат следующему слою. В процессе обучения нейронные сети корректируют свои веса (коэффициенты), чтобы минимизировать ошибку между выходными значениями и желаемыми результатами. Это позволяет сети обучаться и улучшать свою способность к распознаванию образов, классификации, анализу данных и другим задачам.

*Сверточные нейронные сети (CNN)*. CNN обычно используются для классификации, сегментации и задач обнаружения объектов на изображениях. Они также могут быть использованы для генерации новых или восстановления поврежденных изображений. CNN обучаются с использованием больших наборов данных аннотированных изображений, где каждое изображение помечено правильным классом или маской сегментации. Во время обучения сеть регулирует свои веса и смещения, чтобы свести к минимуму разницу между ее выходными данными и метками истинности. Этот процесс известен как обратное распространение во времени (Backpropagation through time, BPTT), который включает в себя вычисление градиентов функции потерь по отношению к параметрам сети на каждом шаге последовательности.

CNN работают, используя серию сверточных слоев для извлечения признаков из входного изображения. Эти слои состоят из набора фильтров, которые применяются к входному изображению для обнаружения определенных особенностей, таких как края, углы или текстуры. Каждый фильтр создает карту объектов, на которой выделяются области изображения, в которых присутствует этот объект.

После сверточных слоев выходные данные проходят через серию объединяющих слоев, которые уменьшают размер карт объектов, сохраняя при этом их основные функции. Конечный результат затем проходит через один или несколько полносвязных слоев, которые выполняют задачу классификации или сегментации.

В биологии CNN применяются в основном для обработки и анализа изображений, полученных в результате микроскопических и других исследований, однако их применение сопряжено с целым рядом трудностей, таких как необходимость большого объема данных для обучения, правильная аннотация изображений, индивидуальный подход к анализу разных типов изображений, учет широкой изменчивости исследуемых объектов, а также необходимость учета фона и масштабов самого объекта.

Ниже приведено несколько примеров применения CNN в биологии:

– Анализ изображений мозга. CNN используется для автоматической сегментации (разделения) изображений мозга на различные области, например, серое и белое вещество. Также это используется, например, для диагностики рака мозга [1].

– Классификация микроорганизмов: CNN может использоваться для классификации различных видов микроорганизмов по их микроскопным снимкам. Это упрощает и ускоряет диагностику инфекционных заболеваний [2].

– Диагностика рака: CNN может использоваться для анализа и автоматической классификации изображений тканей, полученных в результате биопсии, различения здоровой и опухолевой ткани [3].

– Анализ геномных данных в виде матриц взаимодействия генов, на основе сходства их экспрессии. Это помогает находить биологически значимые связи между генами и определять, какие гены связаны с различными заболеваниями [4].

– Классификация электрокардиограмм, что может оказать колоссальную помощь в своевременной в диагностике сердечных заболеваний [5].

*Рекуррентные нейронные сети (RNN)* – это еще один тип алгоритма глубокого обучения, который обычно используется для задач последовательного анализа данных. В отличие от CNN, которые используются в первую очередь для анализа изображений, RNN предназначены для обработки данных с временной или последовательной структурой, таких как речь, текст или данные временных рядов.

RNN работают, используя серию повторяющихся слоев, которые позволяют передавать информацию от одного шага последовательности к другому. Каждый рекуррентный слой содержит набор скрытых единиц, которые поддерживают вектор состояния, представляющий память сети о предыдущих шагах в последовательности.

В биологии можно выделить несколько основных направлений, где успешно были применены RNN:

– Предсказание трехмерной структуры белков путем анализа их аминокислотных последовательностей [6].

– Анализ экспрессии генов, выявление закономерностей и прогнозирование функций генов [7].

– Предсказания взаимодействия молекула – мишень [8].

– Анализ медицинских изображений и данных пациентов для диагностики таких заболеваний, как рак и болезнь Альцгеймера [9].

– Моделирование нейронной активности и предсказание работы мозга [10].

– Анализ экологических данных, таких как поведение животных и динамика популяций, предсказание изменений в экосистемах [11].

– Анализ генетических данных и предсказание сайтов связывания для транскрипционных факторов [12,13].

*Генеративно-состязательные сети (GAN)* – это тип алгоритма глубокого обучения, состоящий из двух нейронных сетей: генератора и дискриминатора. Сеть генератора принимает случайный шум в качестве входных данных и генерирует поддельные данные, в то время как сеть дискриминатора учится различать поддельные данные, сгенерированные генератором, и реальные данные из обучающей выборки.

Во время обучения генератор пытается создать данные, неотличимые от реальных данных, в то время как дискриминатор пытается правильно определить, какие данные настоящие, а какие поддельные. Две сети обучаются в игровой обстановке, где генератор пытается обмануть дискриминатор, а дискриминатор пытается избежать обмана.

Результатом этого процесса обучения является сеть-генератор, которая может создавать реалистичные данные, аналогичные обучающим данным.

GAN используются для создания новых изображений на основе существующих. Их можно использовать для создания синтетических биологических изображений в учебных целях или для дополнения существующих наборов данных.

Одна из проблем, связанных с GAN, заключается в том, что их сложно обучать, они могут коллапсировать от того, что генератор выдает ограниченный набор выходных данных вместо разнообразных. Однако последние достижения в архитектуре и методах обучения GAN сделали их более стабильными и эффективными для получения высококачественных данных.

В биологии GAN были успешно применены, например, в single-cell RNAseq анализе и предсказании структуры белков [14,15]. Генерация новых образцов в этих случаях может помочь расширить наборы уже существующих данных, оценить качество исходных данных, а также решать задачу прогнозирования состава будущих образцов.

**2. Метод опорных векторов (SVM)** используется для задач классификации и регрессии, особенно полезен он для выявления закономерностей в сложных наборах данных.

SVM работают, находя лучшую гиперплоскость, которая разделяет данные на разные классы. Гиперплоскость выбирается таким образом, чтобы максимизировать разницу между двумя классами, то есть расстояние между гиперплоскостью и ближайшими точками данных для каждого класса.

Алгоритмы SVM особенно полезны при работе с многомерными данными, поскольку они могут обрабатывать большие пространства функций без переобучения. Они также эффективны в случаях, когда данные не являются линейно разделимыми, поскольку SVM могут использовать ядерный трюк для преобразования данных в многомерное пространство, где они становятся разделимыми.

Одним из преимуществ SVM является то, что они эффективны в вычислительном отношении, поскольку им нужно учитывать только подмножество точек обучающих данных, которые находятся ближе всего к границе решения. Это делает SVM хорошо подходящими для больших наборов данных.

Однако SVM могут быть чувствительны к выбору ядерного трюка и настройке гиперпараметров, что может повлиять на их производительность. Кроме того, SVM не очень хорошо подходят для обработки несбалансированных наборов данных, поскольку есть вероятность, что они будут отдавать приоритет наиболее представленным классам.

В целом SVM – это мощный инструмент для задач классификации и регрессии, но их эффективность зависит от тщательного выбора параметров и учета конкретных характеристик набора данных.

В биологии SVM используется для различных задач, основные из которых:

1. Предсказание вторичной структуры белков по их аминокислотной последовательности [16]. Это помогает как в понимании функции белков, как и их взаимодействий в клетке.

2. Анализ геномных данных, классификации генов на активные и неактивные, а также для предсказания экспрессии генов [17].

3. Диагностика различных заболеваний, таких как рак, болезнь Альцгеймера и другие [18]. Алгоритм может использоваться для анализа большого комплекса маркеров, таких как белки, гены, ДНК и другие.

4. Прогнозирование эффективности лекарств на основе данных о генетических вариантах пациентов. Этот подход открывает новые возможности для персонализированной медицины и разработки новых лекарственных препаратов [19].

**3. Байесовские сети** – это тип вероятностной графической модели, которая представляет отношения между переменными с использованием ориентированного ациклического графа (DAG). Узлы на графе представляют собой случайные величины, а ребра – условные зависимости между ними.

Байесовские сети основаны на теореме Байеса, которая представляет собой математическую формулу, описывающую, как обновлять вероятность гипотезы по мере появления новых данных. В байесовской сети вероятность каждого узла зависит только от его родителей в графе, что позволяет легко вычислить совместное распределение вероятностей по всем переменным.

Байесовские сети можно использовать для широкого круга задач, включая классификацию, регрессию и предсказание. Они особенно полезны в ситуациях, когда существует неопределенность или неполнота информации, поскольку они могут включать в себя предшествующие знания и обновлять вероятности по мере поступления новых данных.

Одним из основных преимуществ байесовских сетей является то, что они обеспечивают прозрачный и интерпретируемый способ моделирования сложных систем. Структура графика может выявить причинно-следственные связи между переменными, что может быть полезно для понимания того, как работает система и для прогнозирования ее поведения.

Однако обучение байесовских сетей требует больших вычислительных мощностей, а также может потребовать большого объема данных для достижения хорошей производительности. Кроме того, структура графа должна быть определена изначально, что может быть

затруднительно в ситуациях, когда предварительные знания о системе ограничены.

Примеры применения байесовских нейронных сетей в биологии включают:

– Предсказание структуры белков на основе последовательности аминокислот и их классификация [10,18]. Одним из примеров такой сети является метод Rosetta, который использует байесовские нейронные сети для предсказания структуры белков на основе эмпирических данных.

– Классификация белков. Одним из примеров такой сети является метод PFP, который использует байесовские нейронные сети для классификации белков на основе их функций.

– Анализ генетических данных, включая предсказание генных функций, выявление генных мутаций и анализ экспрессии генов. Один из примеров такой сети является метод BANJO, который использует байесовские нейронные сети для анализа генной экспрессии [20].

**4. Алгоритмы Random forest.** В биологии алгоритмы Random forest используются для решения различных задач, связанных с анализом большого объема табличных данных. Например, они могут быть применены для:

– Предсказания взаимодействий между белками, ДНК, РНК и сайтов их связывания [21,22];

– Предсказания пост-трансляционных модификаций белков [23];

– Прогнозирования риска заболевания на основе медицинских данных [24–27];

– Определения функциональных свойств белков и молекул на основе их структуры и последовательности [24].

**5. Алгоритмы кластеризации** обычно используются в современной биологии для выявления закономерностей и группировки в больших наборах данных, таких как профили экспрессии генов, последовательности белков и т.п. Эти алгоритмы помогают исследователям выявить новые взаимосвязи и открыть новые биологические механизмы.

Конкретный алгоритм выбирается в зависимости от типа данных и задачи исследования. В биологии сейчас используются различные алгоритмы кластеризации, основные из которых приведены ниже:

*Иерархическая кластеризация* – это метод кластерного анализа, который группирует объекты в иерархическую структуру, называемую дендрограммой. Он может быть применен для классификации биологических объектов на основе их генетической информации или других параметров, таких как экспрессия генов, морфологические характеристики и т.д. Например, в работе [28] исследователи использовали этот метод для классификации различных подтипов рака желудка на основе экспрессии генов. В этой работе был проведен сбор

образцов рака желудка и затем была проведена иерархическая кластеризация для выявления различий между подтипами. Результаты показали, что различные подтипы рака желудка имеют различные ответы на ингибиторы PI3K/mTOR и химиотерапевтические препараты, что может быть полезным при выборе лечения для пациентов.

*k-means* – это метод кластерного анализа, который группирует объекты в заранее заданное количество кластеров на основе их сходства. Этот метод также может быть применен для классификации биологических объектов на основе различных параметров. Зачастую *k-means* используется совместно с методами глубокого обучения, что дает очень высокие результаты. Так, например, при совместном применении CNN и алгоритма *k-means* удалось достичь 95.4% точности и 97.1% специфичности в диагностике меланомы по дерматоскопическим снимкам кожных покровов [29].

*DBSCAN (Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise)* – это метод кластерного анализа, который использует плотность объектов в пространстве для группировки их в кластеры. DBSCAN показал свою эффективность в *single-cell RNA-seq* анализе [30], протеомном анализе [18,31].

Таким образом, использование ИИ в анализе биологических данных может существенно изменить подход ученых к своей работе, расширить область их исследований и найти новые пути решения научных и практических задач. Использование нейросетей имеет огромный потенциал в биологии, так как они могут помочь в решении многих сложных задач, которые ранее были недоступны для традиционных методов анализа данных. Уже сейчас методы анализа с применением ИИ, используемые в биологии, показывают высокую производительность, точность работы, соизмеримую или даже превосходящую аналогичный экспертный анализ. Однако стоит понимать, что ИИ не может полностью заменить работу экспертов, он лишь указывает, на что исследователям необходимо обращать внимание, а также помогает облегчить рутинный анализ данных. Поскольку технологии продолжают развиваться, мы можем ожидать появления еще более продвинутых приложений ИИ в этой области в ближайшие годы.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Chattopadhyay A., Maitra M.* // Neurosci. Informatics. Elsevier Masson SAS. 2022. 2(4): 1-6.
2. *Shaily T., Kala S.* // 2020 IEEE 17th India Council International Conference, INDICON. 2020. p. 1-6.
3. *Dabeer S., Khan M.M., Islam S.* // Informatics Med. Unlocked. Elsevier Ltd. 2019. 16(May): 1-11.



4. Pillai A., Grabowski P., John B. // bioRxiv. 2021. P. 1-9.
5. Cheng J., Zou Q., Zhao Y. // BMC Med. Inform. Decis. Mak. BioMed Central. 2021. 21(1): 1-12.
6. Senior A.W. et al. // Nature. 2020. 577(7792): 706-10.
7. Raza K., Alam M., Parveen R. // ArXiv. 2014. 1-18.
8. Wang Y. Bin et al. // BMC Med. Inform. Decis. Mak. 2020. 20(S2): 1-9.
9. Ji W. et al. // Hereditas. 2022. 159(1): 1-16.
10. Güçlü U., van Gerven M.A.J. // Front. Comput. Neurosci. 2017. 11: 1-14.
11. Perry G.L.W. et al. // Ecosystems. 2022. 25(8): 1700-18.
12. Monti M. et al. // Entropy. 2022. 24(141): 1-22.
13. Shen Z., Bao W., Huang D.S. // Sci. Rep. 2018. 8(1): 1-10.
14. Lopez R. et al. // Nat. Methods. 2018. 15(12): 1053-8.
15. Repecka D. et al. // Nat. Mach. 2021. 3(4): 324-33.
16. Mandle A.K. // Int. J. Soft Comput. 2012. 3(1): 67-78.
17. Devi Arockia Vanitha C., Devaraj D., Venkatesulu M. // Procedia Comput. Sci. 2014. 47: 13-21.
18. Aydin Z. et al. // BMC Bioinformatics. 2011. 12: 1-21.
19. Berthelet J., Foroutan M., Bhuya D.D. et al. // Cancers (Basel). 2022. 14(10): 2404.
20. Park S.B. et al. // Clin. Exp. Metastasis. 2020. 37(6) 657-74.
21. Chen X., Ishwaran H. // Genomics. 2012. 99(6): 323-9.
22. Fan W. et al. // Amino Acids. 2014. 46(4) 1069-78.
23. Tasmia S.A. et al. // Sci. Rep. 2022. 12(1): 1-14.
24. Hakala K. et al. // IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma. 2022. 19(3): 1772-81.
25. Khalilia M., Chakraborty S., Popescu M. // BMC Med. Inform. Decis. Mak. 2011. 11(51): 1-13.
26. Ooka T. et al. // BMJ Nutr. Prev. Heal. 2021. 4(1): 140-8.
27. Pal M., Parija S. // Journal of Physics: Conference Series. 2021. 1817: 1-8.
28. Lei Z. et al. // Gastroenterology. 2013. 145(3): 554-65.
29. Nawaz M. et al. // Microsc. Res. Tech. 2022. 85(1): 339-51.
30. Peyvandipour A. et al. // Sci. Rep. 2020. 10(1): 1-12.
31. Arauz-Garofalo G. et al. // Proteomes. 2021. 9(2): 1-19.

\*\*\*

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

### А

<i>Абаленихина Ю.В.</i>	421
<i>Абрамов А.А.</i>	384, 404
<i>Абрамов А.Ю.</i>	376, 496
<i>Абрамочкин Д.В.</i>	394, 608
<i>Адашева Д.А.</i>	188
<i>Азев В.Н.</i>	148
<i>Алейникова О.В.</i>	571, 576
<i>Александрюшкина Н.А.</i>	301
<i>Алексеев В.Б.</i>	580
<i>Аликина И.Н.</i>	580
<i>Алмазов Н.Д.</i>	126
<i>Андрианов В.В.</i>	694
<i>Андрианова Н.В.</i>	720
<i>Антипова Н.В.</i>	474, 680
<i>Антонов В.Г.</i>	87, 153
<i>Арбатский М.С.</i>	272, 301
<i>Арсланов А.И.</i>	694
<i>Артемьева М.М.</i>	188, 199
<i>Архипов Д.А.</i>	647
<i>Архипов Д.В.</i>	652
<i>Асатурова А.В.</i>	262
<i>Асташев М.Е.</i>	174

### Б

<i>Бабаев А.А.</i>	25
<i>Бабаев В.М.</i>	636
<i>Бабурина Ю.Л.</i>	338
<i>Бадюлина В.И.</i>	87, 153
<i>Баев А.Ю.</i>	164, 732
<i>Бакаева З.В.</i>	143, 215, 241, 254
<i>Балалаева И.В.</i>	684
<i>Балашов Н.В.</i>	645
<i>Балезина О.П.</i>	439, 463
<i>Басалова Н.А.</i>	272, 301
<i>Батальщикова С.А.</i>	43
<i>Бахтеева В.Т.</i>	491
<i>Бахтюков А.А.</i>	71, 506, 553, 613
<i>Бахчинян Е.</i>	301

<i>Бачурин С.С.</i>	502
<i>Баюнова Л.В.</i>	613
<i>Белинская Д.А.</i>	37, 512, 517, 528, 703
<i>Белова С.П.</i>	192, 207, 208
<i>Белослудцев К.Н.</i>	311
<i>Белослудцева Н.В.</i>	311, 357, 590
<i>Беляева А.А.</i>	668
<i>Бережнов А.В.</i>	345, 595, 600, 709
<i>Бобкова Н.В.</i>	357
<i>Богачева П.О.</i>	453, 463
<i>Богданов А.Л.</i>	247
<i>Богущи В.В.</i>	734
<i>Болдова А.Е.</i>	21, 542
<i>Бондарев А.Д.</i>	130
<i>Борзых А.А.</i>	120, 194
<i>Борисова- Мубаракишина М.М.</i>	645
<i>Боровиков Ю.С.</i>	247
<i>Бочкова М.С.</i>	115
<i>Бравкова Е.В.</i>	652
<i>Брезгунова А.А.</i>	720
<i>Будаговская Н.В.</i>	629
<i>Булавина М.К.</i>	632
<i>Буров А.А.</i>	289
<i>Бутрим В.А.</i>	262
<i>Бутузова Д.А.</i>	272
<i>Бухараева Э.А.</i>	416
<i>Быстрова М.Ф.</i>	64

### В

<i>Вавилов Н.Э.</i>	227
<i>Валитова Ю.Н.</i>	636
<i>Варламова Е.Г.</i>	25, 289
<i>Васильева С.В.</i>	31
<i>Ведунова М.В.</i>	482
<i>Велхадзе Т.Ф.</i>	194, 315
<i>Ветошкина Д.В.</i>	645
<i>Вечкапова С.О.</i>	458
<i>Виговский М.А.</i>	301, 315

<i>Винокуров А.Ю.</i>	333, 496	<i>Горбачева Л.Р.</i>	254, 537
<i>Вишнякова П.А.</i>	262	<i>Гордеев И.И.</i>	221
<i>Владыченская Е.А.</i>	199	<i>Горюнов К.В.</i>	278, 289
<i>Войтенко Н.Г.</i>	37, 77	<i>Григорова И.Л.</i>	21
<i>Волков Е.М.</i>	126	<i>Григорьева Е.Р.</i>	390
<i>Волкова А.А.</i>	158	<i>Григорьева О.А.</i>	301, 315
<i>Вологин Д.С.</i>	469	<i>Гришина Е.В.</i>	324
<i>Волошин Н.С.</i>	180, 696, 746	<i>Гузенко В.В.</i>	43
<i>Воронина П.А.</i>	37, 77, 512, 558, 703	<i>Гуреев А.П.</i>	318
<i>Воронина Я.А.</i>	404, 523	<i>Гусакова В.С.</i>	568
<i>Воронцова М.В.</i>	170, 180	<i>Гусакова С.В.</i>	568
<i>Высоких М.Ю.</i>	315	<i>Гуськова В.О.</i>	608
<i>Высоцкая О.В.</i>	283	<i>Гуцеваров Д.А.</i>	199
		<i>Гуцин Е.И.</i>	568

## Г

<i>Габдулхакова А.Г.</i>	399
<i>Гаврилов М.Ю.</i>	308
<i>Гавриш М.С.</i>	482
<i>Газитаева З.И.</i>	542
<i>Гайдин С.Г.</i>	409
<i>Гайдуков А.Е.</i>	439, 444
<i>Гайнуллина Д.К.</i>	120
<i>Гайнутдинов Х.Л.</i>	694
<i>Галеева Е.И.</i>	636
<i>Галецкий С.А.</i>	668
<i>Галкина К.В.</i>	274, 348, 352
<i>Гамбарян С.П.</i>	158
<i>Ганем А.</i>	77, 558
<i>Ганцова Е.А.</i>	262
<i>Гаспарян М.Э.</i>	474
<i>Гахова Э.Н.</i>	81
<i>Гетман И.А.</i>	652
<i>Гефтер С.Д.</i>	684
<i>Гилиждинова К.Р.</i>	249
<i>Глушанкова Л.Н.</i>	390
<i>Голованов Е.А.</i>	568
<i>Гондаренко Е.А.</i>	680
<i>Гончаров Н.В.</i>	37, 77, 512, 517, 528, 558, 703, 713, 717

## Д

<i>Дворжак А.Ю.</i>	622
<i>Демьяненко С.В.</i>	266, 502
<i>Деркач К.В.</i>	71, 506, 553, 613
<i>Дерябина И.Б.</i>	694
<i>Дзряя В.А.</i>	43
<i>Дмитриева С.А.</i>	106, 469
<i>Добрецов М.Г.</i>	92, 110
<i>Добрылко И.А.</i>	158
<i>Долгачева Л.П.</i>	528
<i>Долгих О.В.</i>	580
<i>Дубинин М.В.</i>	371
<i>Дынник В.В.</i>	324
<i>Дьякова Е.Ю.</i>	211, 231
<i>Дюкина А.Р.</i>	429, 478
<i>Дя Г.А.</i>	199

## Е

<i>Егоров Ю.В.</i>	49
<i>Елистратова И.В.</i>	58
<i>Еникеев А.Д.</i>	668
<i>Ефименко А.Ю.</i>	272, 301, 315
<i>Ефремов М.Ю.</i>	684

## Ж

<i>Жданова Д.Ю.</i>	357
<i>Жердев А.А.</i>	254
<i>Жигачева И.В.</i>	328

## З

<i>Заморина С.А.</i>	115
<i>Зарипова К.А.</i>	192, 207, 208
<i>Захарова А.Н.</i>	211
<i>Згода В.Г.</i>	227
<i>Згодова А.А.</i>	241
<i>Згодова А.Е.</i>	143
<i>Здобнова Т.А.</i>	684
<i>Зиганшин Р.Х.</i>	81
<i>Зиновьева А.А.</i>	301
<i>Зинченко В.П.</i>	409, 528
<i>Зоров Д.Б.</i>	720
<i>Зорова Л.Д.</i>	278, 720
<i>Зубарев И.В.</i>	180
<i>Зубова С.В.</i>	53

## И

<i>Ибрагимова А.Г.</i>	262
<i>Иванов О.А.</i>	537
<i>Иванова А.Д.</i>	188, 394, 433
<i>Иванова А.М.</i>	182
<i>Иванова В.П.</i>	533
<i>Ивановская Е.В.</i>	542
<i>Ивановская Ю.А.</i>	542
<i>Ильзоркина А.И.</i>	311
<i>Ильясов П.В.</i>	734
<i>Исакова А.А.</i>	474
<i>Исмаилова Д.Х.</i>	675

## К

<i>Кабанова Н.Н.</i>	64
<i>Казаков М.С.</i>	333
<i>Казакова О.А.</i>	580
<i>Казантаева М.</i>	71
<i>Казначеева Е.В.</i>	390

<i>Каймачников Н.П.</i>	133
<i>Калашиников В.Е.</i>	233
<i>Калинина А.А.</i>	568
<i>Калинина Е.А.</i>	308
<i>Калинина Н.И.</i>	182, 689
<i>Калиникова Ю.Г.</i>	211
<i>Калюжная Ю.Н.</i>	266
<i>Кандалова О.В.</i>	58
<i>Капилевич Л.В.</i>	211, 231
<i>Капустина П.А.</i>	71
<i>Карпичева О.Е.</i>	247
<i>Карпушин М.Ю.</i>	684
<i>Кархов А.М.</i>	404
<i>Катаев А.А.</i>	545
<i>Катруха А.Г.</i>	188
<i>Кашико Н.Д.</i>	364, 367
<i>Кирова Ю.И.</i>	584
<i>Кирюхина О.О.</i>	120
<i>Кислухина Е.Н.</i>	215
<i>Кичигина В.Ф.</i>	590
<i>Клычников О.И.</i>	272
<i>Кнорре Д.А.</i>	274, 348, 352, 364, 367
<i>Коваленко Н.П.</i>	64
<i>Ковалицкая Ю.А.</i>	64
<i>Колачевская О.О.</i>	647, 652
<i>Колесников Д.О.</i>	390
<i>Колесников С.С.</i>	102, 133
<i>Коллантай О.В.</i>	211
<i>Колмогоров В.С.</i>	537
<i>Комельков А.В.</i>	668
<i>Конорова М.С.</i>	433
<i>Копылова Е.Е.</i>	64
<i>Корнюшин О.В.</i>	71
<i>Коробкина Ю.Д.</i>	139
<i>Коровина М.О.</i>	399
<i>Корокозова М.В.</i>	482
<i>Корф Е.А.</i>	77, 558
<i>Косенков А.М.</i>	409
<i>Косякова Н.И.</i>	53, 429
<i>Крамарова Л.И.</i>	81
<i>Краснова А.Н.</i>	469
<i>Крестинин Р.Р.</i>	338

<i>Крестинина О.В.</i>	338
<i>Крещенко Н.Д.</i>	221
<i>Крикунова Н.И.</i>	328
<i>Крицкая К.А.</i>	345, 595, 600, 709
<i>Крутецкая З.И.</i>	87, 153
<i>Крутецкая Н.И.</i>	153
<i>Кубасов И.В.</i>	92, 110
<i>Кудрявцев Д.С.</i>	680
<i>Кудрявцев И.В.</i>	717
<i>Кузнецов Г.В.</i>	221
<i>Кузнецова В.С.</i>	506
<i>Кузнецова Е.А.</i>	333
<i>Кузьмин В.С.</i>	384, 394, 404, 523
<i>Кузьмин И.В.</i>	120
<i>Кукушкина И.В.</i>	227
<i>Кулебякин К.Ю.</i>	130, 170, 180, 182, 301, 689, 696
<i>Кулебякина М.А.</i>	272
<i>Кулиш А.Д.</i>	478
<i>Куньев А.Р.</i>	657
<i>Курочкина Н.С.</i>	315
<i>Кучин А.В.</i>	221

## Л

<i>Лаврова Е.А.</i>	491
<i>Лакомкин В.Л.</i>	384
<i>Лапашина А.С.</i>	348, 352, 739
<i>Ларюшкин Д.П.</i>	345, 409, 709
<i>Лебедев И.А.</i>	506, 553, 613
<i>Лебедева И.Ю.</i>	571, 576
<i>Леднев Е.М.</i>	194
<i>Лизунова Н.В.</i>	215
<i>Лимарева Л.В.</i>	734
<i>Лисина О.Ю.</i>	143
<i>Ломакина А.К.</i>	278
<i>Ломин С.Н.</i>	647
<i>Лу Иньхуа</i>	632
<i>Львова И.Д.</i>	207, 225, 259
<i>Ляпон А.О.</i>	58

## М

<i>Мазалов В.В.</i>	675
<i>Мазур Д.В.</i>	474, 680
<i>Макарова Н.П.</i>	308
<i>Маломуж А.И.</i>	249, 450
<i>Мальков А.Е.</i>	590
<i>Манских В.Н.</i>	720
<i>Манухова Л.А.</i>	315
<i>Марей М.В.</i>	315
<i>Маркова О.В.</i>	274, 348, 352
<i>Мартьянов А.А.</i>	359
<i>Масулис И.С.</i>	64
<i>Махмудов А.Р.</i>	164
<i>Махновский П.А.</i>	194, 227
<i>Медведева В.П.</i>	590
<i>Медведева Н.А.</i>	188, 199
<i>Мельницкая А.В.</i>	87
<i>Микулинская Г.В.</i>	148
<i>Миленина Л.С.</i>	153
<i>Милованова К.Г.</i>	211, 231
<i>Миндукшев И.В.</i>	158
<i>Минибаева Ф.В.</i>	636
<i>Мирзоев Т.М.</i>	233
<i>Миронова Г.Д.</i>	357, 590
<i>Митева А.С.</i>	439
<i>Митрошина Е.В.</i>	482
<i>Митьковский Д.Е.</i>	221
<i>Митяшова О.С.</i>	571, 576
<i>Михайлова Г.З.</i>	81
<i>Мищуков А.А.</i>	359
<i>Мовсесян С.О.</i>	221
<i>Молчанова А.И.</i>	444
<i>Монтвила Е.К.</i>	571, 576
<i>Морина И.В.</i>	613
<i>Мосенцов А.А.</i>	590
<i>Мочалова Н.В.</i>	221
<i>Муравьев Г.С.</i>	364
<i>Мусаева А.А.</i>	148
<i>Мякушина Ю.А.</i>	652

**Н**

<i>Надеев А.Д.</i>	713, 717
<i>Нвосу Ч.Д.</i>	486
<i>Небесная К.С.</i>	164
<i>Некрасова А.А.</i>	241, 254
<i>Немировская Т.Л.</i>	207, 208
<i>Непша О.С.</i>	308
<i>Никишин Д.А.</i>	433
<i>Никогосян М.А.</i>	221
<i>Николаев М.Ю.</i>	170, 180
<i>Никоношина Н.А.</i>	580
<i>Новикова Е.В.</i>	92, 110
<i>Новожиллов А.В.</i>	77, 558
<i>Новоселецкая Е.С.</i>	301
<i>Номеровская М.А.</i>	390
<i>Носкова Е.О.</i>	274
<i>Нуруллин Л.Ф.</i>	106, 126

**О**

<i>Одинокова И.В.</i>	338
<i>Орлов О.И.</i>	194
<i>Орлова А.А.</i>	211
<i>Ословский Е.М.</i>	662

**П**

<i>Павлова Е.К.</i>	371
<i>Панаит А.И.</i>	725
<i>Пантелеев М.А.</i>	139
<i>Парнова Р.Г.</i>	491
<i>Певзнер И.Б.</i>	278, 720
<i>Петросян Р.А.</i>	221
<i>Пинелис В.Г.</i>	215, 254
<i>Плотников Е.Ю.</i>	278, 720
<i>Погонялова М.Ю.</i>	333
<i>Погорелов А.Г.</i>	725
<i>Погорелова В.Н.</i>	725
<i>Пономарева А.А.</i>	469
<i>Попков В.А.</i>	720
<i>Попов В.Н.</i>	318
<i>Попов Д.В.</i>	194, 227, 315
<i>Попов Д.Ю.</i>	333

<i>Попова И.Ю.</i>	215
<i>Попова Н.М.</i>	421
<i>Поспелов А.Д.</i>	684
<i>Потапенко Е.Ю.</i>	367
<i>Потапова Д.А.</i>	453
<i>Поцелуева М.М.</i>	563
<i>Правдивцева Е.С.</i>	453
<i>Призова Н.К.</i>	657
<i>Просвирнин А.В.</i>	384
<i>Проскура А.Л.</i>	96, 458
<i>Прохоренко И.Р.</i>	53
<i>Прохоров Д.А.</i>	148
<i>Пустовит О.Б.</i>	394

**Р**

<i>Ратушняк А.С.</i>	96, 458
<i>Ратушняк М.Г.</i>	283
<i>Рахматуллина Д.Ф.</i>	636
<i>Ренкова А.Г.</i>	636
<i>Решетин Д.С.</i>	390
<i>Рогачев В.В.</i>	25
<i>Рогачевская О.А.</i>	102
<i>Родькин С.В.</i>	486
<i>Романов Г.А.</i>	647, 652, 662
<i>Романов Е.А.</i>	308
<i>Романова И.В.</i>	613
<i>Россомахин Р.А.</i>	106
<i>Рощина В.В.</i>	657
<i>Рубинштейн А.А.</i>	717
<i>Рустамова С.И.</i>	164

**С**

<i>Сабиров Р.З.</i>	164
<i>Савельева Е.М.</i>	662
<i>Савинкова И.Г.</i>	254
<i>Самарцев В.Н.</i>	371
<i>Сариев А.У.</i>	732
<i>Сафронова В.Г.</i>	399, 429
<i>Свешникова А.Н.</i>	21, 139, 359, 425, 542
<i>Северюхина М.С.</i>	174

Сеидкулиева А.А. 421  
 Селиванова Е.К. 120  
 Семенова А.А. 371  
 Сергеева К.В. 233  
 Серебряная Д.В. 188, 199  
 Серёгина Е.С. 496  
 Серов Д.А. 174, 311  
 Сибгатуллина Г.В. 249, 416  
 Сидоренко Д.А. 225, 259  
 Сидорина А.Н. 542  
 Сизова А.И. 734  
 Силантьева Д.И. 694  
 Силачев Д.Н. 262, 266, 278,  
 289, 308, 720  
 Симонян А.О. 153  
 Синькевич И.А. 652  
 Сиренко В.В. 247  
 Ситдииков Ф.Г. 236  
 Ситдиикова Г.Ф. 236  
 Скляр М. 296  
 Скулачев В.П. 315  
 Слепнев А.А. 421  
 Смаглий Л.В. 568  
 Смекалова А.А. 571, 576  
 Соколов А.А. 684  
 Соколов В.В. 133  
 Солтани Г.А. 657  
 Сонин Д.Л. 71  
 Сотникова Л.Д. 338  
 Станкевич А.А. 725  
 Старинец В.С. 311  
 Старкова К.Г. 580  
 Стельмащук О.А. 376  
 Степанов А.В. 92, 110  
 Стрелков М.С. 262  
 Стрелкова П.Л. 482  
 Сурин А.М. 143, 215, 241, 254  
 Сухов И.Б. 92  
 Сысоев М.Д. 425

## Т

Табеева Г.И. 262

Танканаг А.В. 174  
 Тарабыкин В.С. 25  
 Тарасова Е.О. 463  
 Тарасова О.С. 120  
 Таржанов И.А. 241  
 Тарлачков С.В. 148  
 Теплов И.Ю. 409  
 Теренина Н.Б. 221  
 Терехина О.Л. 584  
 Тимашев П.С. 720  
 Тиманова В.П. 115  
 Тихонова И.В. 429, 478  
 Тишкова М.В. 247  
 Ткачев С.Ю. 720  
 Ткачук В.А. 689  
 Токмакова А.Р. 249  
 Томиловская Е.С. 194  
 Третьяков Д.О. 739  
 Трулев А.С. 717  
 Трушина Д.Б. 684  
 Туровский Е.А. 25, 289  
 Тыганов С.А. 207,  
 192, 225, 233, 259  
 Тюрин-Кузьмин П.А. 130, 170,  
 180, 182, 301, 618,  
 675, 689, 696, 746  
 Тяпкина О.В. 106

## У

Уваева В.Л. 636  
 Ужвиюк С.В. 115  
 Усачев В.А. 180  
 Успенко Н.И. 590  
 Утешев В.К. 81

## Ф

Фатерыга В.В. 657  
 Фатхудинов Т.Х. 262  
 Федоров А.В. 404  
 Федоров Н.С. 450  
 Федотова Е.И. 345, 595, 600, 709

<i>Федотчева Н.И.</i>	324
<i>Фенюк Б.А.</i>	348, 352, 739
<i>Филатова Т.С.</i>	394, 608
<i>Филина Ю.В.</i>	399
<i>Филиппов Ю.А.</i>	92, 110
<i>Фок Е.М.</i>	158, 491
<i>Фокина Е.А.</i>	506, 553, 613
<i>Фролова В.С.</i>	433

## **Х**

<i>Хабиб С.</i>	77, 558
<i>Хабибрахманова В.Р.</i>	636
<i>Хаертынов К.С.</i>	399
<i>Хайбулаева Л.М.</i>	657
<i>Хайтин А.М.</i>	502
<i>Хамитов Д.Р.</i>	21
<i>Хмиль Н.В.</i>	590
<i>Хохлов А.А.</i>	102
<i>Хузахметова В.Ф.</i>	416
<i>Хундерякова Н.В.</i>	590
<i>Хусаинов Р.Р.</i>	96

## **Ц**

<i>Ценцевичский А.Н.</i>	416
--------------------------	-----

## **Ч**

<i>Чапров К.Д.</i>	496
<i>Чевкина Е.М.</i>	668
<i>Челуснова Ю.В.</i>	512, 528
<i>Черкашин А.П.</i>	102
<i>Черных А.Е.</i>	231
<i>Чернышёв В.С.</i>	296
<i>Чернышев К.А.</i>	463
<i>Чернышов С.В.</i>	148

<i>Чечехин В.И.</i>	130, 182, 618, 675, 689
<i>Чечехина Е.С.</i>	301, 696, 746
<i>Чибалин А.В.</i>	211
<i>Чистякова О.В.</i>	92

## **Ш**

<i>Шайдуллов И.Ф.</i>	236
<i>Шайхутдинова Э.Р.</i>	174
<i>Шалыгин А.В.</i>	390
<i>Шапошникова Д.А.</i>	283
<i>Шардина К.Ю.</i>	115
<i>Шарипов Р.Р.</i>	143, 215, 241, 254
<i>Шарло К.А.</i>	207, 225, 259
<i>Шаронова И.Н.</i>	622
<i>Швецова А.А.</i>	120
<i>Швецова Ю.А.</i>	278, 289, 308
<i>Швецова Ю.С.</i>	262
<i>Шенкман Б.С.</i>	192, 207, 208, 225, 233, 259
<i>Шитикова Е.Ю.</i>	333
<i>Шмуклер Ю.Б.</i>	433
<i>Шпаков А.О.</i>	71, 506, 553, 613

## **Щ**

<i>Щулькин А.В.</i>	421
---------------------	-----

## **Я**

<i>Яголович А.В.</i>	474
<i>Якимова А.С.</i>	308
<i>Якушева Е.Н.</i>	421
<i>Яшин В.А.</i>	221, 657
<i>Яценюк А.</i>	296



## НАШИ ПАРТНЕРЫ



лабораторное оборудование и реактивы

БиоПик – молодая компания по поставкам лабораторного оборудования и реактивов. Осуществляем поставки по всем городам России. БиоПик предлагает широкий выбор товаров, необходимых для научных исследований. Наш опыт работы в научных институтах и сфере продаж позволяет нам в кратчайшие сроки дать рекомендацию как по выбору расходных материалов, реактивы, так и по подбору необходимого оборудования для Ваших исследований. Обращайтесь в нашу Компанию, и Вы обязательно останетесь довольны! [www.biopik.ru](http://www.biopik.ru)

Диаэм – это первая российская компания, ориентированная на комплексное оснащение лабораторий научных учреждений, биотехнологических и фармацевтических производств. Мы обладаем экспертными знаниями и специализируемся в следующих направлениях: генетический анализ, молекулярная биология, клеточные технологии и протеомика, биотехнология, микробиология, химический анализ и синтез.



Наш 35-летний опыт позволяет не только прекрасно разбираться в мировых рыночных трендах лабораторного оборудования, но и в научно-исследовательских задачах, которые можно решить при его помощи.

Мы работаем с крупнейшими российскими и зарубежными производителями и являемся держателями прямых контрактов.

Сайт [www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru) – это крупнейший лабораторный онлайн-гипермаркет с развитой сетью региональных сайтов, насчитывающий более 1 млн. товарных позиций.



ХИММЕД — крупнейший поставщик химических реактивов, биохимии, лабораторного и аналитического оборудования на российском рынке. Компания основана в 1991 году. В наличии на складе более 28 тысяч наиболее востребованных клиентами позиций реактивов, стандартов, растворителей, лабораторного и аналитического оборудования, расходных материалов!

Мы предлагаем:

- амплификаторы классические и в реальном времени;
- система для выделения НК;
- лабораторное оборудование и посуда;
- дозаторы;
- пластик для культуральных работ и молекулярной биологии;
- реактивы химические и биохимические.

Проверьте наличие необходимого вам товара на складе ХИММЕД, прежде чем заказывать в другом месте! [www.chimmed.ru](http://www.chimmed.ru)

Научное издание

Международная конференция (22-26 мая 2023 г.)

**РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ**

Сборник статей

Том 2

Под редакцией

А.В. Бережнова, В.П. Зинченко

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 10.05.2023. Формат 60x84<sub>1/16</sub> Бумага офсетная

Печать цифровая. Печ. л. 22,15.

Тираж 40 экз. Заказ 125.

Типография Пятый Формат

г. Серпухов, ул. Водонапорная 36, оф. 224.

тел.: 8 916 648 21 98

e-mail: [studio@5format.ru](mailto:studio@5format.ru)

ISBN 978-5-6049994-2-4



ISBN 978-5-6049994-0-0

