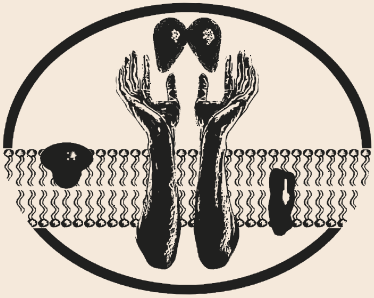
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК, ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК,
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК –
ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ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

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

19–23 мая 2025 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией
А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой

Пущино
2025

УДК 576.3
ББК 28.05
Р 45

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

Локальный оргкомитет:
д.б.н. *Бережнов А.В.*, к.б.н. *Федотова Е.И.*, к.б.н. *Надеев А.Д.*,
к.б.н. *Мальцева В.Н.*, к.б.н. *Гайдин С.Г.*, к.б.н. *Крицкая К.А.*,
к.б.н. *Ларюшкин Д.П.*, *Цай А.А.*, *Сидорова М.В.*, *Тюрин Ф.В.*

Р45 **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. /** Под редакцией А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2025. – 378 с.

ISBN 978-5-6049994-4-8 (Т. 1)
ISBN 978-5-6049994-5-5

С 19 по 23 мая 2025 г. в г. Пущино проходила Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены тексты 131 статьи по материалам докладов участников конференции.
В первый том вошли разделы:
– общие и частные вопросы сигнализации;
– сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов;
– кальциевая сигнализация;
– сигнализация в мышечных клетках;
– посттрансляционные модификации в регуляции внутриклеточных процессов;
– сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
– особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках.
Второй том содержит разделы:
– сигнализация в нейронах и синапсах;
– внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация;
– сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика;
– сигнализация в растительных клетках;
– действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации;
– новые подходы и методы клеточных исследований.

УДК 576.3
ББК 28.05

ISBN 978-5-6049994-4-8 (Т. 1)
ISBN 978-5-6049994-5-5

© Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2025

СОДЕРЖАНИЕ

Том 1

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ СИГНАЛИЗАЦИИ

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА ПРИ МЕТАМОРФОЗЕ У АКСОЛОТЛЯ
Абрамочкин Д.В., Джуманиязова И.Х., Филатова Т.С. 22

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С МЕМБРАННЫМИ БЕЛКАМИ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ
Белинская Д.А., Гончаров Н.В. 24

КАК цАМФ МОДУЛИРУЕТ РАБОТУ И ФОТООТВЕТЫ КОЛБОЧЕК РАЗНЫХ СПЕКТРАЛЬНЫХ ТИПОВ?
Громова Г.Е., Николаева Д.А., Веселов Я.С., Калита А.Д., Астахова Л.А. 31

НЕКОТОРЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ФОРМЫ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК КОЖИ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ
Кандалова О.В., Ляпон А.О., Елистратова И.В. 37

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA* (PLATYHELMINTHES)
Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д. 41

ДИНАМИКА МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У ПЛАНАНИЙ *GIRARDIA TIGRINA* В ПРИСУТСТВИИ СЕРОТОНИНА И МЕЛАТОНИНА
Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д. 46

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ 5-АМИНО-N-(ТРЕТ-БУТИЛ)-4-{4-[3-(2-ГИДРОКСИ-3-МОРФОЛИНОПРОПОКСИ)ПРО-1-ИН-1-ИЛ]ФЕНИЛ}-2-(МЕТИЛТИО)ТИЕНО[2,3-*d*]-ПИРИМИДИН-6-КАРБОКСАМИДА, КАК НОВОГО ПОЗИТИВНОГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА
Печальнова А.С., Назаров И.Р., Деркач К.В., Диденко Е.А., Сорокоумов В.Н., Шпаков А.О. 53

СРАВНИТЕЛЬНОЕ *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ КСЕНОГЕННЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ И ЭЛАСТИНОВЫХ МАТРИЦ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ
Пятина К.В., Минайчев В.В., Звягина А.И., Фадеева И.С. 59

АНАЛИЗ ПРИНЦИПОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН СИНАПСОВ
Ратушняк А.С., Шевырина В.А., Сорокоумов Е.Д., Проскура А.Л. 66

ПРОФИЛИ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ СУБЭПИКАРДА СЕРДЦА СУСЛИКОВ *SPERMOPHILUS PYGMAEUS* В ПЕРИОД ИХ АКТИВНОСТИ И ГИБЕРНАЦИИ
Степанов А.В., Добрецов М.Г., Филиппов Ю.А., Никитина Е.Р., Бекшоков К.С., Кубасов И.В. 73

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ИОННЫХ КАНАЛОВ И РЕЦЕПТОРОВ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ КАНАЛОВ PIEZO1 В ГЛАДКО-МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТЕНОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ
Гайнуллина Д.К., Борзых А.А., Печкова М.Г., Богоцкой К.А., Тарасова О.С. 80

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ ПИРАМИДНЫХ КЛЕТОК ПОЛЯ CA1 И ГРАНУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ФАСЦИИ ГИППОКАМПА ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИЯ
Галашин А.С., Конаков М.В., Дынник В.В. 86

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНАНА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АФФЕРЕНТОВ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ, ВЫЗВАННУЮ АГОНИСТАМИ P2X- И TRPV1 РЕЦЕПТОРОВ
Гилиждинова К.Р., Ананьев А.С., Петров А.М., Ситдикова Г.Ф. 92

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ Na^+ В ЦИТОЗОЛЕ СПОСОБСТВУЕТ ДЛИТЕЛЬНОМУ ПОТЕНЦИАЛУ ДЕЙСТВИЯ И НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОКОЯ В МИОКАРДЕ ПРОКСИМАЛЬНОЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ У КРЫС
Егоров Ю.В., Иванова А.Д., Филатова Т.С., Воронина Я.А., Пустовит О.Б., Кархов А.М., Кузьмин В.С. 97

ОБОНЯТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ВО ВКУСОВОЙ ТКАНИ: ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ «ШУМ» ИЛИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫЙ СИГНАЛ
Кабанов А.В., Коваленко Н.П., Масулис И.С. 105

ИНГИБИТОР 12/15-ЛИПОКСИГЕНАЗ БАЙКАЛЕЙН ПОДАВЛЯЕТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ
Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г. 110

АКТИВАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ ИОННОГО ТРАНСПОРТА В ПРЕДНЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД В ООЦИТАХ РЕЧНОЙ МИНОГИ: РОЛЬ ХЛОРИДНЫХ КАНАЛОВ
Никитина Е.Р., Шерстобитов А.О., Никифоров А.А. 116

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ $P2Y_1$ РЕЦЕПТОРА НЕОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛИФОСФАТАМИ
Рустамов Х.Р., Махмудов А.Р., Икромова Ф.Р., Ветрова Е.А., Винокуров А.Ю., Раззокков Дж.И., Абрамов А.Ю., Баев А.Ю. 125

DE NOVO ДИЗАЙН НОВЫХ БЕЛКОВ МОДУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ
Рустамов Х.Р., Небесная К.С., Майоров С.А., Гайдин С.Г., Косенков А.М., Баев А.Ю. 128

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГОРМОНА РОСТА В ГРАНУЛЕЗНОМ СЛОЕ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ ЗАВИСИТ ОТ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭНДОКРИННЫХ ФАКТОРОВ
Смекалова А.А., Костюнина О.В., Лебедева И.Ю. 131

ИЗВЕСТНЫЕ И НЕИЗВЕСТНЫЕ ХРОМОФОРЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ
Терпугов Е.Л., Дегтярева О.В. 137

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МУТАНТНОГО ВАРИАНТА VEGFR3 C.3175G>C (P.A1059P), АССОЦИИРОВАННОГО С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ
Филина Ю.В., Фейсханов А.К., Гайсина Э.А., Мифтахова Р.Р. 143

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

ДИНАМИЧЕСКИЙ СЕТЕВОЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ
Асташев М.Е. 150

ТЕТРАПЕПТИД НАЕЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЕ НА КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА
Баженов П.А., Винокуров А.Ю., Козин С.А., Абрамов А.Ю. 156

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ НАТИВНЫХ МЕМБРАН И ЛИПИДНЫЙ МАТРИКС
Борисова М.П., Катаев А.А., Поцелуева М.М. 162

ИММУНОДЕПРЕССАНТ YM-58483 ПОДАВЛЯЕТ ВХОД Ca^{+} В МАКРОФАГАХ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ
Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И. 170

IP_3-ЗАВИСИМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ИЗ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В АСТРОЦИТАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА
Погонялова М.Ю., Ератова Л.В., Винокуров А.Ю., Абрамов А.Ю. 176

АНАЛИЗ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ КЛЕТОК НЕК-293 НА АЦЕТИЛХОЛИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАЗОВЫХ ТРАЕКТОРИЙ
Соколов В.В., Каймачников Н.П., Рогачевская О.А., Кабанова Н.В., Колесников С.С. 182

ИЗУЧЕНИЕ ВЫБОРА ПУТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ
Сулягина В.П., Косарева Р.С., Калинин А.Ю., Бондарев А.Д., Щербакова Л.Н., Чечехина Е.С., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А. 189

ЧТО ПРОИСХОДИТ В МЕМБРАНЕ И ЛЮМЕНЕ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА С УЧАСТИЕМ КАЛЬЦИЯ И МИТОХОНДРИЙ?
Сурин А.М. 196

УЧАСТИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ В ПТГ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК
Усачёв В.А., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Воронцова М.В. 199

СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

ЭКСПРЕССИЯ КЛЮЧЕВЫХ Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗ В ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ
Белова С.П., Тыганов С.А., Зарипова К.А., Шенкман Б.С. 205

ПРИ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ИСЧЕЗАЕТ ВКЛАД K_{ATP}-КАНАЛОВ В NO-ОПОСРЕДОВАННОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ, ЧТО МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО С НАРУШЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ИХ СУБЪЕДИНИЦ
Давыдова М.П., Марков М.А. 207

ВЛИЯНИЕ 3-НЕДЕЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ НА ПРОФИЛЬ мРНК И МИКРОРНК В РАЗНЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ НОГ У ЧЕЛОВЕКА
Махновский П.А., Панкратьева П.А., Борзых А.А. Курочкина Н.С., Попов Д.В. 213

ОЦЕНКА РОЛИ Na,K-АТФазы И DHPR ПРИ 3-ДНЕВНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ КРЫС НА СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ Ca^+ И СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *M. SOLEUS*
Немировская Т.Л., Шарло К.А., Тыганов С.А., Сидоренко Д.А., Боков Р.О., Зарипова К.А. 216

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЫШЦ ГОЛЕНИ КРЫСЫ В МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЯ ДВИЖЕНИЯ
Сабирова Д.Э., Шадрина А.А., Еремеев А.А., Балтина Т.В. 219

ГАММА-АМИНОМАСЛЯНАЯ КИСЛОТА В МИОГЕНЕЗЕ: ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ
Сибгатуллина Г.В., Токмакова А.Р. 224

АНТИОКСИДАНТ MITO-TEMPO ВЛИЯЕТ НА АТРОФИЮ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ ПОСЛЕ 7 СУТОК ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ
Сидоренко Д.А., Львова И.Д., Шарло К.А. 228

ВКЛАД КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 В ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПАЛЬМИТОИЛКАРНИТИНА НА КАРДИОМИОЦИТЫ
Цай А.А., Дынник В.В., Пименов О.Ю., Федотова Е.И., Бережнов А.В. 232

НАРУШЕНИЕ РАННЕГО ФОСФОПРОТЕОМНОГО ОТВЕТА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ НА ПРИЕМ ПИЩИ ПРИ ОЖИРЕНИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА
Якупова Э.И., Леднев Е.М., Подкуйченко Н.В., Верпхвадзе Т.Ф., Смирнов И.П., Згода В.Г., Вавилов Н.Э., Томилова А.О., Воротников А.В., Шестакова М.В., Попов Д.В. 235

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ p53 В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА
Батальщикова С.А. 239

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ МИШЕНЕЙ АПТАМЕРОВ К ГЛИОБЛАСТОМЕ КАК МАРКЕР КАНЦЕРОГЕНЕЗА
Глазырин Ю.Е., Замай Т.Н., Кичкайло А.С. 245

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ E2F1 В НЕЙРОНАХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
Гузенко В.В. 250

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ С НЕУПОРЯДОЧЕННОЙ СТРУКТУРОЙ В РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОК МОЗГА
Демьяненко С.В. 257

РОЛЬ FOXO1 И FOXO3A В ГИБЕЛИ И ВЫЖИВАНИИ НЕЙРОНОВ ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ
Калюжная Ю.Н. 260

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ C-MYC ПО ЛИЗИНАМ 148 И 323 В НЕЙРОНАХ ПОСЛЕ ФТИ
Куницына А.Е. 266

СИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И В УСЛОВИЯХ СТРЕССА. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ У ЭРИТРОЦИТОВ ПТИЦ
Волкова А.А., Миндукшев И.В. 272

РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ НАКОПЛЕНИИ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ В ГЕПАТОЦИТАХ
Дмитриева С.А., Гиниятуллина Д.М., Вологин Д.С., Пономарева А.А. 280

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НИМЕСУЛИДА НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ СТРУКТУПНЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ МИТОХОНДРИЙ
Дмитриева С.А., Гумерова А.И., Пономарева А.А. 285

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ МОНОМЕРНЫХ ЭЛЛАГОТАННИНОВ *IN VITRO*
Кабанов Д.С., Балеев Д.Н., Сидельников Н.И. 291

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ-САМЦОВ НА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВАЦИЮ АСТРОЦИТОВ КОРЫ МОЗГА
Куртова Е.Е., Абдыева А.А., Себенцова Е.А., Симоненко С.Д., Горбачева Л.Р. 300

СТАКСАНТИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ AC16, ВЫЗВАННУЮ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА
Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Ломовская Я.В., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В. 304

ЭКСПРЕССИЯ CX43 В НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ
Нвосу Ч.Д., Кириченко Е.Ю., Родькин С.В. 311

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ КРЫСЫ
Пшемыский М.А., Гусакова С.В., Гусакова В.С., Смаглий Л.В. 316

H_2S-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ p53 В НЕЙРОНАХ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ
Родькин С.В. 318

ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
Семерня Е.П., Солдатова А.В., Сариев А.У., Варламова Е.Г., Гудков С.В., Туровский Е.А., Баев А.Ю. 324

ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИЗАЦИИ В СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ PCSK9 И АДРОННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО С МУТАЦИЕЙ STK11 УСИЛИВАЕТ ОНКОСУПРЕССОРНЫЙ ЭФФЕКТ
Ганцова Е.А., Арутюнян И.В., Шакирова К.М., Соболева А.Г., Кананыхина Е.Ю., Бальчир Д.Б., Гордон К.Б., Фатхудинов Т.Х. 329

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ АПТАМЕРАМИ ПОДАВЛЯЕТ РОСТ ГЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ *IN VIVO*
Горбушин А.К., Воронковский И.И., Грек Д.С., Лузан Н.А., Кошманова А.А., Народов А.А., Замай Г.С., Коловская О.С., Федотовская В.Д., Лукьяненко К.А., Замай Т.Н., Vittorio de Franciscis, Кичкайло А.С. 333

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ CD33+ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА К ДЕЙСТВИЮ АНТРАЦИКЛИНОВ В ТРЕХМЕРНЫХ КУЛЬТУРАХ
Краснов К.С., Мещерякова Е.И., Ломовская Я.В., Фадеева И.С., Кобякова М.И., Фадеев Р.С. 338

НОВЫЙ МАРКЕР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ – KCNB2
Лалетин В.А., Ткачук В.А., Чечехин В.И. 344

УСТОЙЧИВОСТЬ МАКРОФАГОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ОМЛ К КВИЗАРТИНИБУ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОДАВЛЕНИЕМ ГЕНА FLT3 И СНИЖЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА FLT3
Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Краснов К.С., Ломовский А.И., Мещерякова Е.И., Фадеев Р.С. 350

УЧАСТИЕ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ В СИНХРОНИЗАЦИИ ОТВЕТА КУЛЬТУРЫ МСК НА ПТГ
Смажило К.Ю., Усачёв В.А., Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю. 355

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ВЫБОРЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Чечехин В.И., Калинина Н.И., Антропова Ю.Г., Ткачук В.А. 362

МЕТАГЕНОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Федорова М.С., Павлов В.С., Филатова А.А., Калинин Д.В. 368

ГЕРАНИЛГЕРАНИЛАЦЕТОН ПОДАВЛЯЕТ ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МСК
Щебетина М.В., Усачёв В.А., Смажило К.Ю., Замотина М.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Воронцова М.В. 372

Том 2

СИГНАЛИЗАЦИЯ В НЕЙРОНАХ И СИНАПСАХ

ДОМИНИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОЗРЕВАНИЯ НЕЙРОТРОФИНА МОЗГА ОБЕСПЕЧИВАЕТ ЕГО РЕТРОГРАДНОЕ ВЛИЯНИЕ В НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ
Богачева П.О., Потапова Д.А., Гайдуков А.Е. 382

ЭФФЕКТ ЭНДОГЕННЫХ ПУРИНОВ НА ВЫЗВАННОЕ ЭЛЕКТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕРВА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И УРОВЕНЬ АФК В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ
Гиниатуллин А.Р. 388

СЕРОТОНИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ
Крещенко Н.Д., Митьковский Д.Е. 393

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ МУСКУЛАТУРЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA*
Крещенко Н.Д., Митьковский Д.Е. 398

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ ТОНИЧЕСКОГО ВЫДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ СИНАПСЕ
Маломуж А.И. 403

РОЛЬ Ca^{+}-АКЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ КРУГООБОРОТА ВЕЗИКУЛ В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ
Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М. 408

ИНТЕРФЕРОН α2b УВЕЛИЧИВАЕТ АКТИВНОСТЬ AMPA И КАИНАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В АФФЕРЕНТНОМ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ ВЕСТИБУЛЯРНОГО АППАРАТА ЛЯГУШКИ
Рыжова И.В., Тобиас Т.В. 414

СРАВНЕНИЕ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ И НЕ СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ AMPA-РЕЦЕПТОРЫ
Рязанцева П.Е., Бережнов А.В., Гайдин С.Г., Зинченко В.П., Косенков А.М., Ларюшкин Д.П., Майоров С.А. 419

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА И ДЕГРАДАЦИИ 2-АРАХИДОНОИЛГЛИЦЕРИНА И АНАНДАМИДА КАК СПОСОБ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ С РАЗНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ
Тарасова Е.О., Богачева П.О., Абрарова Г.Ф., Балезина О.П. 425

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ

ДОБАВЛЕНИЕ К КУЛЬТУРАЛЬНЫМ СРЕДАМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ У ЧЕЛОВЕКА
Ахмедова З.Ф., Сысоева А.П., Гаврилов М.Ю., Зингеренко Б.В., Шевцова Ю.А., Силачев Д.Н., Непша О.С., Макарова Н.П., Кулакова Е.В., Калинина Е.А. 432

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДАХ, СОКУЛЬТИВИРОВАННЫХ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ДОНОРА
Гаврилов М.Ю., Макарова Н.П., Сысоева А.П., Жучков В.А., Чернышев В.С., Калинина Е.А. 435

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА АССИМЕТРИЧНОЙ ГЛУБИННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ
Гаврилов М.Ю., Багдасарян А.А., Макарова Н.П., Сысоева А.П., Зингеренко Б.В., Калинина Е.А. 441

ПРИМЕНЕИЕ ЭКЗОСОМ ПРОДУЦИРУЕМЫХ КОСТНОМОЗГОВЫМИ МСК ДЛЯ ТЕРАПИИ ОРДС
Есмагамбетов И.Б., Грошева А.Г., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Генкина Е.Н. 446

ИНДУКЦИЯ ФИНАЛЬНОГОСОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСРЕДСТВОМ СУБЗОНАЛЬНОЙ МИКРОИНЪЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ
Зингеренко Б.В., Макарова Н.П., Сысоева А.П., Евтушенко Е.А., Кулакова Е.В., Калинина Е.А. 452

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ СЕКРЕТОМА, АССОЦИИРОВАННОГО СО СТАРЕНИЕМ В ФОРМИРОВАНИИ И ПОДДЕРЖАНИИ СЕНЕСЦЕНТНОГО ФЕНОТИПА МСК
Каменков С.С., Чечехин В.И., Зиновьева А.А., Бахчинян Е., Ефименко А.Ю., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Чечехина Е.С. 456

МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАНЫ ИЗ АЦЕТАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ ЖИДКОЙ БИОПСИИ
Моисеева Е.О., Кожевникова Д.Д., Ященок А.М., Сергеев И.С., Алентов И.И., Горин Д.А., Чернышев В.С. 462

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МОЧИ В МОДЕЛИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧКИ
Певзнер И.Б., Ломакина А.К., Брезгунова А.А., Горюнов К.В., Силачёв Д.Н., Плотников Е.Ю. 464

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИЙ. БИОЭНЕРГЕТИКА

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ РАЗОБЩИТЕЛИ: ФАНТАСТИКА ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ
Антоненко Ю.Н., Котова Е.А. 474

АССОЦИИРОВАННЫЕ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ МУТАЦИИ мтДНК ФОРМИРУЮТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП УЧАСТВУЮЩИХ В ПАТОЛОГИИ КЛЕТОК
Винокуров А.Ю., Попов Д.Ю., Погонялова М.Ю., Федотова Е.И., Бережнов А.В. 476

ИНГИБИРОВАНИЕ ДЫХАНИЯ И ЦИКЛА КРЕБСА ПИРУВАТОМ
Гришина Е.В., Федотчева Н.И., Дынник В.В. 481

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ: ОТ КЛЕТОЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ К СИСТЕМНОМУ ВОСПАЛЕНИЮ
Гуреев А.П., Нестерова В.В., Бабенкова П.И., Грибовская В.А., Аджемян Д.С., Иванов М.Э., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н. 489

АМБИОЛ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К ДЕЙСТВИЮ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ
Жигачева И.В., Крикунова Н.И., Миль Е.М., Голощапов А.Н., Расулов М.М. 495

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПО АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РЕДОКС ИНДИКАТОРОВ В ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ
Зорова Л.Д., Каргапольцева А.С., Семенович Д.С., Фомин Е.О., Пантелеева А.А., Лямзаев К.Г., Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б. 501

СТРАТЕГИЯ РАЗВИТИЯ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И БОРЬБЫ С ОПУХОЛЯМИ НА ОСНОВАНИИ ЗНАНИЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЭУКАРИОТОВ, ОБИТАЮЩИХ В ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ
Зоров Д.Б., Зорова Л.Д., Бабенко В.А., Семенович Д.С., Певзнер И.Б., Иванова А.Е., Зоров С.Д., Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю., Сухих Г.Т. 506

ОСТРАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ ПЕЧЕНИ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ, СВЯЗАННОЙ С КОМПЛЕКСОМ I, НО НЕ С КОМПЛЕКСОМ II – ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ СУКЦИНАТА
Икромова Ф.Р., Стопницкий А.А., Баев А.Ю. 512

СНИЖЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ (*UROCITELLUS UNDULATUS*) В ПРОЦЕССЕ ВХОДА В СОСТОЯНИЕ ГИБЕРНАЦИИ
Комелина Н.П., Амерханов З.Г. 516

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛИРУЕМОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ И НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫС WISTAR
Кулишенко А.А., Боков Р.О., Галкин Г.В., Туртикова О.В., Шенкман Б.С. 522

β-ЭКДИСТЕРОН УЛУЧШАЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ БИОЭНЕРГЕТИКУ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ ПРИ РОТЕНОНОВОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
Небесная К.С., Газиева Ш.Ф., Чарышникова О.С., Левицкая Ю.В., Сыров В.Н., Баев А.Ю. 526

ЛОКАЛЬНОЕ СОПРЯЖЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ С ПОМОЩЬЮ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ
Нестеров С.В., Ягужинский Л.С. 529

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В НАТИВНОМ ЛИПИДНОМ ОКРУЖЕНИИ С ПОМОЩЬЮ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ
Новождён М.В., Нестеров С.В., Чесноков Ю.М., Жарова Т.В., Гривенникова В.Г., Ягужинский Л.С. 535

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ХЕНОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ИНКУБИРУЕМЫХ В СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО ИОННОГО СОСТАВА
Павлова Е.К., Самарцев В.Н. 541

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОКАРБОНОВЫХ И α,ω-ДИКАРБОНОВЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С МИТОХОНДРИЯМИ ПЕЧЕНИ, В ТОМ ЧИСЛЕ И ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ
Павлова С.И., Самарцев В.Н., Дубинин М.В. 546

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ЛАКТАТА И ГЛУТАМИНА В УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК К ИШЕМИИ, ГИПОКСИИ И НЕДОСТАТКУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ
Плотников Е.Ю., Туровский Е.А., Андрианова Н.В., Бабенко В.А., Буян М.И., Черкесова К.С., Брезгунова А.А., Варламова Е.Г., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров Д.Б. 551

FLIM МИКРОСКОПИЯ FAD В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ
Попов Д.Ю., Горюнов И.А., Кандурова К.Ю., Потапова Е.В., Дремин В.В., Винокуров А.Ю., Абрамов А.Ю. 557

СИГНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВВЕДЕНИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКА АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТА В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫС НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ РАЗГРУЗКИ
Сидоренко Д.А., Боков Р.О., Галкин Г.В., Львова И.Д., Кулишенко А.А., Шарло К.А., Шенкман Б.С. 563

ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА ФИБРОБЛАСТЫ С МУТАЦИЕЙ, СВЯЗАННОЙ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
Федотова Е.И., Крицкая К.А., Шарапов М.Г., Мальцева В.Н., Бережнов А.В. 566

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ГИБЕРНАЦИИ: РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
Шемарова И.В., Никитина Е.Р. 573

СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОБОВ И ДЫХАНИЕ БАКТЕРОИДОВ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ
Богданова Д.С., Крылова В.В. 584

ВЛИЯНИЕ БЛОКИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ
Будаговская Н.В. 590

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ МЕНЯЕТ ИХ СУБКЛЕТОЧНУЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ
Ломин С.Н., Савельева Е.М., Архипов Д.В. 594

СТРАТЕГИЯ ИЗУЧЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
Рощина В.В., Сергиевич Л.А., Яшин В.А., Кучин А.В., Крайнюк Е.С., Солтани Г.А., Шовкун М.М., Демидов В.Э., Куньев А.Р., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. 598

РЕГУЛЯЦИИ STATE TRANSITIONS В КЛЕТКАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*
Рыжих Ю.С., Рашимова А.Д., Борисова-Мубаракшина М.М., Ветошкина Д.В. 605

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ У КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ
Богатова К.С., Яковлева О.В. 609

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЕНЕЗА ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ, ВОЗРАСТНЫХ И ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
Гончаров Н.В., Попова П.И., Белинская Д.А., Войтенко Н.Г., Савельева Е.И., Авдонин П.В. 614

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ СЕМАГЛУТИДА И ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У САМЦОВ КРЫС С ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА
Деркач К.В., Басова Н.Е., Федорчук И.В., Печальнова А.С., Шпаков А.О. 621

VBIT-4 СНИЖАЕТ КАЛЬЦИЕВУЮ ПЕРЕГРУЗКУ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ДИСТРОФИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ DMDDEL8-34/DBA И СПОСОБСТВУЕТ УСТРАНЕНИЮ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ КАЛЬПАИНОВ
Дубинин М.В., Семенова А.А., Черепанова А.А., Устинова А.С., Хорошавина Е.И., Поликарпова А.В., Логинов В.А., Егорова Т.В. 627

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
Иванова В.П. 632

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПАННЕКСИНА 1 НА СОКРАЩЕНИЕ АРТЕРИЙ БРЫЖЕЙКИ МЫШИ ПРИ ПЕРЕВЯЗКЕ ОБЩЕГО ЖЕЛЧНОГО ПРОТОКА
Кирюхина О.О., Печкова М.Г., Тарасова О.С. 637

ВОЗМОЖНОСТИ ШИРОКОПОЛЬНОЙ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ В РЕЖИМЕ РЕГИСТРАЦИИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЙ В КОРЕ ГЛОВОНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫХ ЛОКАЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ
Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Дубас В.И., Сурин А.М., Бакаева З.В. 644

ИЗМЕНЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И МИКРОРЕОЛОГИИ ДОНОРСКИХ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ
Козлова Е.Д., Скверчинская Е.А., Букатин А.С., Филиппова О.И., Колосков А.В., Миндукшев И.В. 650

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ И МАЛЫХ ДОЗ СОЛЕЙ АММОНИЯ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ КРЫС В МОДЕЛИ ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ПЛАВАНИЯ
Корф Е.А., Новожилов А.В., Миндукшев И.В., Гончаров Н.В. 656

ДИНАМИКА РЕПАРАЦИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ
Лисина О.Ю., Красильникова И.А., Шарипов Р.Р., Московцев А.А., Бакаева З.В., Сурин А.М. 664

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ NADPH-ОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА
Митрошина И.Ю., Филина Ю.В., Дюкина А.Р., Сафронова В.Г. 672

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИРУВАТА В ТОКСИЧЕСКОЙ ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
Надеев А.Д., Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В. 679

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР РОСТА ИЗМЕНЯЕТ РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
Никитина Е.Р., Захарова И.О., Баюнова Л.В., Шуколюкова Е.П., Чеботарева М.А., Катюхин Л.Н. 683

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ГЕНЕРАЦИИ АФК У МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА
Сафронова В.Г., Дюкина А.Р. 690

ПЕРИЦИТЫ ЯВЛЯЮТСЯ КЛЮЧЕВЫМИ ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫМИ ФАКТОРАМИ В СОСУДАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА
Сюткина В.В., Антропова Ю.Г., Калинина Н.И., Ткачук В.А., Чечехин В.И. 695

МАГНИТОМЕХАНИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ НАНОДИСКАМИ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫМИ АПТАМЕРАМИ
Федотовская В.Д., Кошманова А.А., Лузан Н.А., Коловская О.С., Замай Т.Н., Лукьяненко К.А., Морозов Е.В., Швед Н.А., Мохов А.А., Лапин И.Н., Кичкайло А.С., Замай С.С. 699

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ И РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
Фролова В.С., Никишина Ю.О., Никишин Д.А. 705

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ЭКСПРЕССИЮ PDL-1 И CD73 МИЕЛОИДНЫМИ СУПРЕССОРНЫМИ КЛЕТКАМИ И ИХ ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ
Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Усанина Д.Ю., Бочкова М.С., Заморина С.А. 711

НОВЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ
Бондарев А.Д., Чечёхин В.И., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А. 719

МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ ТРОМБОЦИТОВ
Герда Б.А., Волкова А.А., Андреева А.Ю., Добрылко И.А., Гамбарян С.П., Миндукшев И.В. 723

МИКРОГЛИЯ – КЛЮЧЕВОЙ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ В МОДЕЛИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*
Закаблуковская А.Е., Мальцева В.Н. 729

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАПАИНА КАК ФЕРМЕНТА ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СПОСОБСТВУЕТ ПОЛУЧЕНИЮ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ МИКРОГЛИИ
Тумозов И.А., Гайдин С.Г., Мальцева В.Н. 734

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК), СОДЕРЖАЩИХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗОНД, ДЛЯ АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЯ АРХИКТЕКТУРЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
У Т.С., Кулебякин К.Ю., Путляева Л.В. 738

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ
Чумарина А. И., Арсланов А. И., Силантьева Д.И., Гайнутдинов Х.Л. 742

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 747

Общие и частные вопросы сигнализации

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА ПРИ МЕТАМОРФОЗЕ У АКСОЛОТЛЯ

Абрамочкин Д.В., Джуманиязова И.Х., Филатова Т.С.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В онтогенезе амфибий имеет место метаморфоз из водной личиночной формы в наземную взрослую форму, представляющий большой интерес не только для биологии развития, но и для эволюционной и экологической физиологии. В частности, метаморфоз сопровождается ремоделированием миокарда, необходимым по всей видимости для адаптации организма к жизни в наземной среде обитания. Идеальным объектом для исследования такого ремоделирования миокарда является аксолотль, неотеническая личинка мексиканской амбистомы (*Ambystoma mexicanum*), у которой метаморфоз можно искусственно индуцировать в лабораторных условиях с помощью тиреоидных гормонов [1]. В нашей работе [2] была поставлена цель продемонстрировать адаптивные изменения ионных токов и электрической активности, сопряженные со структурными изменениями сердца при метаморфозе у мексиканской амбистомы.

Метаморфоз индуцировали добавлением в аквариумную воду тироксина в концентрации 50 нМ в течение полутора месяцев. В ходе работы были зарегистрированы потенциалы действия и основные ионные токи (I_{K1}, I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Na}, I_{CaL}) в желудочковых и предсердных миоцитах аксолотля до метаморфоза, а также взрослой амбистомы. Для кардиомиоцитов животных, прошедших метаморфоз, были характерны потенциалы действия меньшей длительности, что очевидно необходимо для поддержания более высокой ЧСС у взрослых животных. Данные изменения конфигурации потенциалов действия достигаются за счет увеличения плотности медленного калиевого тока задержанного выпрямления I_{Ks} при сохранении неизменной амплитуды быстрого тока I_{Kr}. Также для миоцитов взрослых животных характерны меньшая плотность тока входящего выпрямления I_{K1} и большая плотность быстрого натриевого тока I_{Na}. В результате баланс I_{K1} и I_{Na} изменяется в пользу последнего, повышая возбудимость кардиомиоцитов у взрослой амбистомы по сравнению с аксолотлем. Кроме того, с метаморфозом сопряжено значительное увеличение кальциевого тока как в предсердных, так и в желудочковых клетках, обеспечивающее большую сократимость кардиомиоцитов у взрослого животного, необходимую в условиях жизни на суше. В совокупности все показанные нами электрофизиологические изменения, ассоциированные с метаморфозом, позволяют увеличить производительность сердца у взрослой сухопутной формы амбистомы по сравнению с аксолотлем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Olejnickova V, Kolesova H, Bartos M, Sedmera D, Gregorovicova M. The tale-tell heart: evolutionary tetrapod shift from quatic to terrestrial life-style reflected in heart changes in axolotl (Ambystoma mexicanum). Dev Dyn. 2022;251:1004-1014.
2. Filatova TS, Dzhumaniiazova I, Abramochkin DV. The metamorphosis of amphibian myocardium: moving to heart of the matter. J Exp Biol. 2024;227:jeb247712.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С МЕМБРАННЫМИ БЕЛКАМИ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Белинская Д.А.[1], Гончаров Н.В.[1,2]

[1]ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Введение. Интегративную роль сывороточного альбумина во многом обусловливает его взаимодействие с рядом мембранных белков. Трехмерные структуры макромолекулярных комплексов с участием альбумина еще не получены экспериментально, за исключением комплекса альбумина человека (HSA) с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) [1]. Сведений о молекулярных механизмах взаимодействия HSA с макромолекулами мало, их изучение актуально для лучшего понимания его роли в патофизиологии различных заболеваний. Цель исследования – методами компьютерного моделирования исследовать взаимодействие нативного и модифицированного HSA с мембранными белками, выявить закономерности и структурные особенности этого взаимодействия.

Методы. В качестве объектов исследования были выбраны мембранные белки, прямое взаимодействие которых с HSA описано в литературе: лиганд-связывающий домен рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE), ангиотензин превращающий фермент (ACE) и рецептор трансформирующего фактора роста бета (TGFβR). В качестве трехмерных моделей белков использовали структуры, доступные в базе данных белковых структур (PDB), коды структур: 3JQZ и 2BXD (HSA); 2M1K (RAGE); 2PJY (TGFβR); 7Q3Y (ACE). Подготовка модифицированного HSA описана в [2]. Белок-белковый докинг альбумина с RAGE, TGFβR и ACE проводили с помощью онлайн-сервисов ZDOCK 3.0.2 [3], ClusPro [4] и GRAMM [5]. Конформационные изменения полученных комплексов рассчитывали методом молекулярной динамики (МД) в водном растворе с помощью программы GROMACS [6]. Длина всех симуляций составила 100 нс. Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов СПбПУ.

Результаты. *RAGE.* Накопление конечных продуктов гликирования (AGE) ведет к воспалению и оксидативному стрессу, в основном посредством активации специфических рецепторов AGE (RAGE) [7]. RAGE состоит из трех основных участков: экстраклеточный лиганд-связывающий домен V, домены C1 и C2, одинарная трансмембранная спираль и короткий С-терминальный

цитоплазматический домен. Известно, что AGE (в том числе и AGE-белки) связываются только с V-доменом RAGE [8]. Мажорный белок плазмы крови альбумин подвержен гликированию в первую очередь, поэтому вносит существенный вклад в общий уровень AGE в организме. Методами *in silico* были сконструированы десять моделей гликированного HSA (gHSA), каждой модели соответствовал один модифицированный остаток лизина (карбоксиметил-лизин): Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573, Lys574. Методом макромолекулярного докинга построены комплексы gHSA с V-доменом RAGE, методом МД изучена их стабильность. Согласно данным макромолекулярного докинга и последующей симуляции МД, самым эффективным с точки зрения прочности и специфичности является комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys233, Lys64, Lys525, Lys262 и Lys378. На рис. 1 представлены структуры комплексов RAGE с gHSA, гликированным по Lys233 (самый прочный комплекс по данным МД, рис. 1А) и по Lys525 (самый реактивный лизин согласно литературным данным, рис. 1Б).

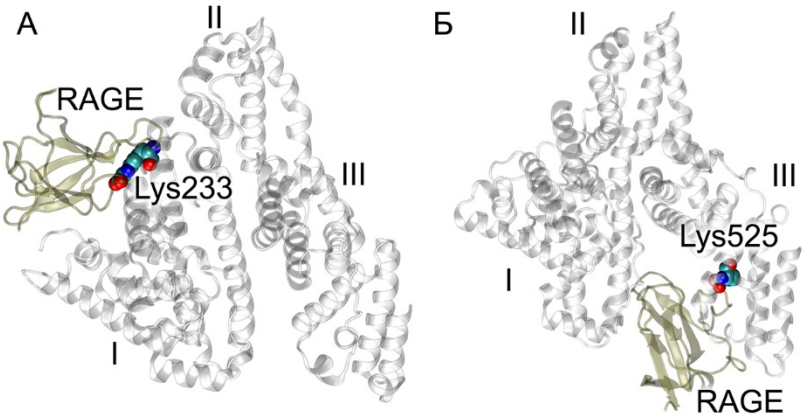


Рис. 1. Структуры комплексов RAGE с gHSA, гликированным по Lys233 (А) и Lys525 (Б). Молекула HSA представлена серой лентой, остов V-домена RAGE – коричневой лентой. Модифицированные лизины показаны цветными сферами. Римскими цифрами отмечены домены HSA.

ACE. Сывороточный альбумин человека (HSA) является эндогенным ингибитором ангиотензин-I-превращающего фермента (ACE). ACT – интегральный мембранный белок, Zn-зависимая протеиназа, которая в межклеточном пространстве катализирует расщепление декапептида ангиотензина I до октапептида ангиотензина II, играя

ключевую роль в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (RAAS). Молекула ACE представляет собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой примерно 150-180 кДа и содержит два высокогомологичных внеклеточных домена, N и C. О механизме взаимодействия альбумина с ACE известно немного, структура комплекса HSA-ACE экспериментально еще не получена. С помощью метода макромолекулярного докинга нами были получены возможные структуры комплексов HSA-ACE. По количеству стерических и полярных контактов между белками выбран комплекс-лидер, его стабильность была проверена методом МД. На рис. 2 представлена структура комплекса-лидера (далее просто комплекс HSA-ACE). В комплексе HSA-ACE, полученным методом макромолекулярного докинга, домен I HSA связывается в углублении между N- и C-доменами ACE, домен II HSA – с N-доменом ACE, домен III HSA – с C-доменом ACE (рис. 2). Архитектура комплекса HSA-ACE не меняется в течение МД-симуляции.

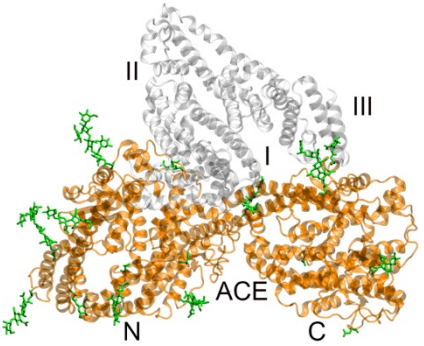


Рис. 2. Наиболее вероятная конформация комплекса HSA-ACE по данным макромолекулярного докинга. Молекулы HSA и ACE представлены серой и оранжевой лентой, соответственно. Сайты гликозилирования ACE показаны зелеными палочками. Римскими цифрами отмечены домены HSA. Символами N и C отмечены N- и C-домены ACE.

TGFβR. Трансформирующий фактор роста бета (TGFβ) −цитокин, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток, участвует в иммунном ответе и патогенезе многих заболеваний [9]. Рецептор TGFβ (TGFβR) локализован в плазматической мембране разного типа клеток и представляет собой димер (TGFβRI-II), образованный мономером TGFβR типа I (TGFβRI) и TGFβR типа II (TGFβRII). После связывания TGFβ с TGFβRII происходит димеризация (рис. 3A) и запуск сигнального каскада через белки Smad [10]. Повреждение гематоэнцефалического барьера может приводить к

тому, что компоненты плазмы, включая альбумин, попадают в паренхиму мозга. Было установлено, что альбумин может поглощаться астроцитами по TGFβR-опосредованному механизму [11]. Поскольку в литературе не представлены данные о механизме взаимодействия альбумина с TGFβR, мы изучили взаимодействие HSA как с мономерами TGFβRI и TGFβRII, так и с димером TGFβRI-II. Был проведен молекулярный докинг HSA на поверхность внеклеточных доменов TGFβRI, TGFβRII и димера TGFβRI-II. Затем конформационные изменения полученных комплексов были рассчитаны методом МД. В комплексе альбумина с димером TGFβRI-II оба мономера рецептора взаимодействуют с доменами I и III HSA (рис.3Б).

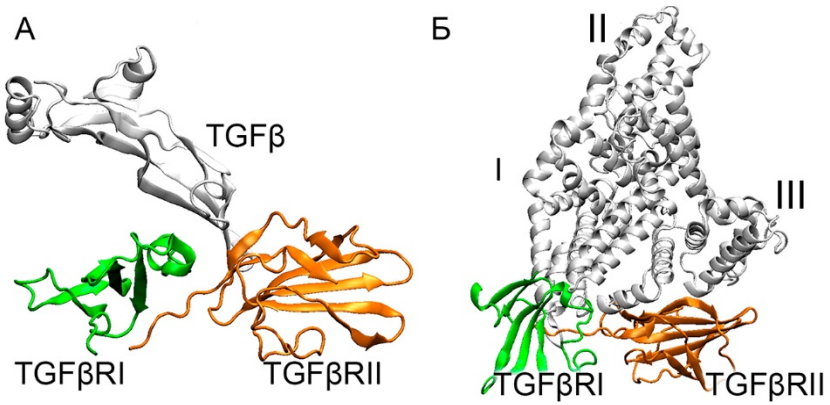


Рис. 3. Взаимодействие димера TGFβRI-II с TGFβ по данным рентгеноструктурного анализа (РСА) [12] (А) и с HSA по данным молекулярного моделирования (Б). Остовы TGFβ и HSA показаны серой лентой, мономера TGFβRI – зеленой, мономера TGFβRII – оранжевой. Римскими цифрами отмечены домены HSA.

Обсуждение. На рис.4 представлена топология сайтов взаимодействия HSA с макромолекулами по данным *in silico* и по данным РСА (комплекс HSA с FcRn, [1]). Как видно из рис. 4, согласно данным молекулярного моделирования и РСА, в норме во взаимодействии альбумина с рассмотренными макромолекулами участвуют одни и те же участки на поверхности белка. Причем к этой тенденции можно отнести не только взаимодействие нативного альбумина с АСЕ (рис. 4Б), TGFβR (рис. 4В) и FcRn (рис. 4Г), но и взаимодействие HSA, гликированного по Lys525, с RAGE (рис. 4А, красным), поскольку лизин Lys525 – основной сайт гликирования белка и может быть гликирован даже у здоровых людей [13]. При патологии к взаимодействию с рецепторами подключаются другие участки на поверхности HSA, как например участок в домене II, взаимодействующий с RAGE после гликирования Lys233 (рис. 4А, синим).

По полученным траекториям МД комплексов HSA с макромолекулами были рассчитаны значения среднеквадратичных колебаний атомов аминокислот альбумина (RMSF). Величина RMSF показывает, какие из аминокислотных остатков наиболее подвижны в процессе конформационных изменений в глобуле белка в процессе симуляции. Анализ RMSF показал, что подвижность доменов I и III друг относительно друга играет важную роль в структурной перестройке глобулы HSA после гликирования и связывания с RAGE. Домены I и III HSA по данным молекулярного моделирования играют ключевую роль и во взаимодействии альбумина с димером TGFβRI-II. В комплексе же с ACE (который по размеру в два раза больше альбумина) максимальной подвижностью обладает домен II и чуть меньшей подвижностью – домен I. Таким образом, подвижная структура альбумина, состоящая из трех доменов, связанных между собой гибкими «шарнирами», позволяет белку подстраиваться для взаимодействия с макромолекулами разного размера.

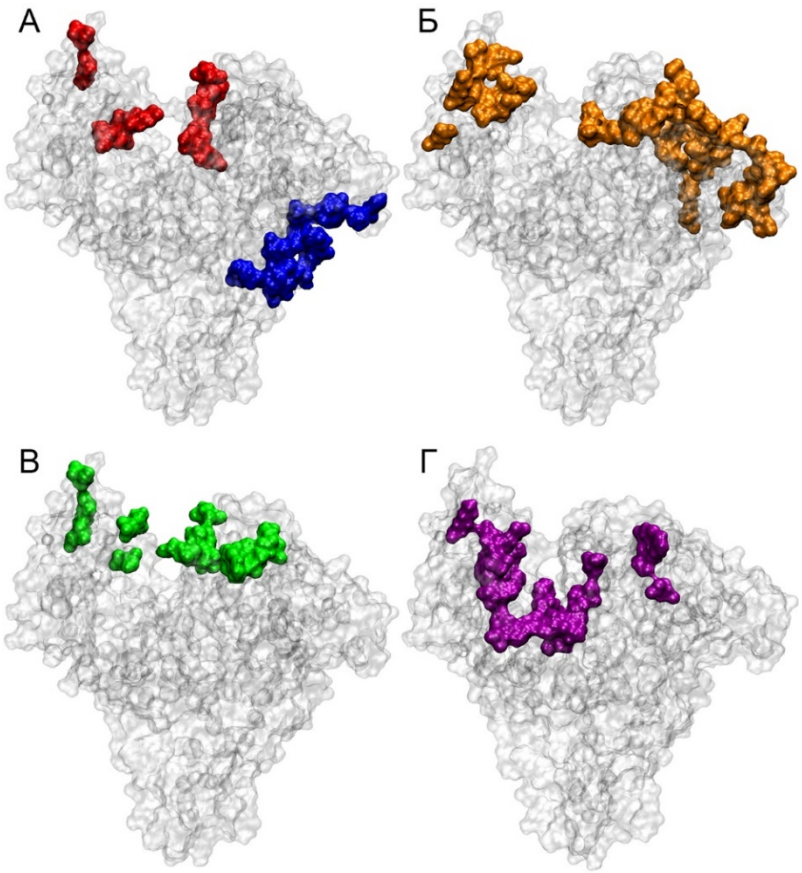


Рис. 4. Топология сайтов взаимодействия HSA с макромолекулами по данным МД (А-В) и РСА (Г). Поверхность HSA показана серым цветом, поверхности сайтов – цветными сферами. А – сайты взаимодействия гликированного HSA с RAGE, красным цветом отмечен сайт альбумина, гликированного по Lys525 (основной сайт гликирования), синим цветом – альбумина, гликированного по Lys233 (самый прочный комплекс по данным МД). Б – сайт взаимодействия нативного HSA с ACE. В – сайт взаимодействия нативного HSA с димером TGFβR. Г – сайт взаимодействия нативного HSA с FcRn [1].

Финансирование. Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oganesyan V, Damschroder MM, Cook KE, Li Q, Gao C, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. J Biol Chem. 2014;289(11):7812–7824.
2. Belinskaia DA, Jenkins RO, Goncharov NV. Molecular Basis for the Involvement of Mammalian Serum Albumin in the AGE/RAGE Axis: A Comprehensive Computational Study. Int J Mol Sci. 2024;25(6):3204.
3. Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. Bioinformatics. 2014;30(12):1771–1773.
4. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. Structure. 2020;28(9):1071–1081.e3.
5. Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. Nucleic Acids Res. 2006; 34:W310–W314.
6. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1–2:19–25.
7. Bettiga A, Fiorio F, Di Marco F, Trevisani F, Romani A, Porrini E, Salonia A, Montorsi F, Vago R. The Modern Western Diet Rich in Advanced Glycation End-Products (AGEs): An Overview of Its Impact on Obesity and Early Progression of Renal Pathology. Nutrients. 2019;11(8):1748.
8. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. J Biol Chem. 1999;274(44):31740–31749.
9. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-β - an excellent servant but a bad master. J Transl Med. 2012;10:183.
10. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF-β Signaling. Biomolecules. 2020;10(3):487.
11. Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. Brain. 2007;130(Pt 2):535-547.
12. Groppe J, Hinck CS, Samavarchi-Tehrani P, Zubieta C, Schuermann JP, Taylor AB, Schwarz PM, Wrana JL, Hinck AP. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. Mol Cell. 2008;29(2):157–168.
13. Bai X, Wang Z, Huang C, Wang Z, Chi L. Investigation of non-enzymatic glycosylation of human serum albumin using ion trap-time of flight mass spectrometry. Molecules. 2012;17(8):8782–8794.

КАК цАМФ МОДУЛИРУЕТ РАБОТУ И ФОТООТВЕТЫ КОЛБОЧЕК РАЗНЫХ СПЕКТРАЛЬНЫХ ТИПОВ?

Громова Г.Е.[1], Николаева Д.А.[1], Веселов Я.С.[1], Калита А.Д.[1,2], Астахова Л.А.[1]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Сенсорные системы животных способны к адаптации к широкому спектру изменяющихся условий. Зрительная система не исключение, и адаптация к интенсивности света происходит уже на уровне фоторецепторных клеток. Хотя основные контуры регуляции, лежащие в основе световой адаптации в палочках и колбочках, сходны, есть в них и ряд отличий. Это связано с различиями в их функциях: палочки являются рецепторами сумеречного зрения, а колбочки – дневного зрения. Поиск новых контуров регулирования каскада фототрансдукции, лежащих в основе световой и темновой адаптации, а также подстройки работы фоторецепторов в соответствии с суточными ритмами, привел к получению данных о важной роли цАМФ в регулировании зрительной трансдукции; но в то же время роль цАМФ-опосредуемых регулировок изучена явно недостаточно, и остается много пробелов, особенно в менее изученном типе фоторецепторов - колбочках сетчатки. Ранее в нашей лаборатории в электрофизиологических экспериментах на одиночных клетках было показано, что повышение внутриклеточного уровня цАМФ, сопоставимого по своей величине с реальными суточными колебаниями цАМФ в сетчатке, вызывает более чем двукратный рост чувствительности палочек к световым стимулам [1], а также что насыщающая фоновая засветка приводит к росту уровня цАМФ во фракции наружных сегментов палочек [2]. В этом контексте нетривиальным представляется вопрос о том, существует ли цАМФ-зависимая регулировка каскада фототрансдукции в колбочках. Колбочки – дневные фоторецепторы, работающие при высоких освещенностях, в сумерках почти утрачивают свой вклад в зрение. Увеличение чувствительности в «темную» фазу для них кажется функционально не оправданным. В то же время цАМФ-зависимая регулировка в колбочках могла бы существовать независимо от циркадных ритмов, помогая им быстро и эффективно подстраиваться под изменяющиеся уровни освещенности в условиях дневной картины мира. Так, нами ранее было показано, что искусственное повышение уровня цАМФ в колбочках карася замедляет кинетику выключения фотоответа,

не изменяя чувствительности колбочек к свету [3]. Кроме того, для стадии личинок рыб данио рерио было показано, что повышение уровня цАМФ замедляет темновую адаптацию в колбочках, и происходит это через регулировку фосфорилирования киназы G-белок-сопряженного рецептора (GRK) [4]. Таким образом, есть потребность в детальном изучении эффектов повышения уровня цАМФ в колбочках разных спектральных типов, чтобы пролить свет на вопрос, какую роль данная регулировка играет в подстройках цветового зрения.

Материалы и методы. Хорошим объектом для такого рода исследования являются рыбы данио рерио. Этот вид животных имеет преимущественно колбочковую сетчатку (приблизительно 60 % фоторецепторов в сетчатке взрослых рыб составляют колбочки). Богатая колбочками сетчатка данио рерио сходна с центральной ямкой сетчатки человека. Более того, профиль экспрессии киназ G-белок-сопряженного рецептора (GRK), выключающих зрительный пигмент после его возбуждения, и являющихся мишенью регулировки цАМФ, в палочках и колбочках данио рерио схож с профилем экспрессии GRK у человека.

Для регистрации ответов колбочек отдельных спектральных типов мы применяли два метода: 1) метод регистрации тока одиночных фоторецепторов при помощи всасывающей пипетки [5] и 2) *ex vivo* электроретинография (ЭРГ) с выделением фоторецепторного ответа [6].

При регистрации тока одиночных колбочек из сетчаток рыб готовились препараты суспензии фоторецепторов, они помещались в перфузионную камеру, где колбочки фиксировались во всасывающей пипетке в конфигурации «наружный сегмент вовнутрь» (рис.1А). Спектральный тип колбочки определялся путем сравнения чувствительности конкретной клетки к световым стимулам по трем каналам световой стимуляции на основе светодиодов (зеленый (λ_{max} 525 нм, красный (632 нм) и синий (460 нм)), наличие которых позволяет исследовать в данной экспериментальной установке три из четырех спектральных типов колбочек данио рерио (красно, зелено- и синечувствительные), но не позволяет исследовать УФ-чувствительные колбочки. После регистрации фотоответов в нормальном растворе Рингера, с целью повышения уровня цАМФ на колбочку воздействовали 10 мкМ форсколином (активатором аденилатциклазы) и анализировали, как данное воздействие влияет на различные параметры фотоответов. Кроме того, проводились и контрольные эксперименты, в которых колбочки в течение такого же периода времени инкубировались в растворе Рингера с DMSO (растворитель, применяемый для форсколина).

Ex vivo ЭРГ проводилась на изолированных сетчатках данио рерио, для этого применялась типичная камера Уссинга, два компартмента которой, разделенные сетчаткой, соединялись с парой хлорсеребряных

электродов, и разность потенциалов на электродах через усилитель передавалась для записи на компьютер (рис. 1Б). Сначала для каждого препарата сетчатки записывалась тотальная ЭРГ, содержащая а- и в-волну, затем фоторецепторный ответ выделялся фармакологически путем добавления к перфузионному раствору 10 мМ аспартата натрия, который блокирует синаптическую передачу от фоторецепторных клеток к биполярным. Затем выделялся ответ красночувствительных колбочек (КЧ). Для выделения ответа КЧ колбочек применялись световые стимулы красного света, который получали при прохождении света белого диода через красный стеклянный фильтр КС11. Стимул с таким спектром (λ_{max} =626 нм) должен из всех фоторецепторов данио рерио возбуждать только красночувствительные колбочки (рис. 1В). Аналогично экспериментам с изолированными колбочками, при ex vivo ЭРГ для повышения уровня цАМФ также использовался форсколин в концентрации 10 мкМ.

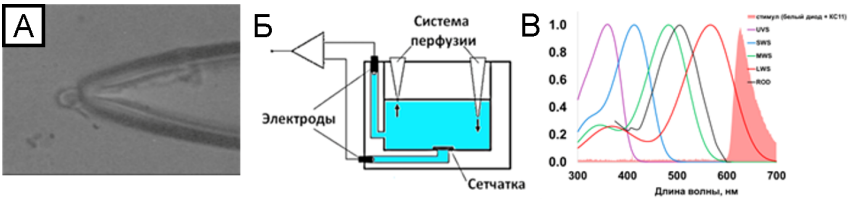


Рис. 1. Способы регистрации ответов колбочек рыб данио рерио разных спектральных типов. А – регистрация тока изолированной колбочки при помощи всасывающей пипетки. Фотография пипетки и зафиксированного в ней наружного сегмента одной из колбочек. Б – схема установки для ex vivo ЭРГ. В – спектры поглощения зрительных пигментов четырех спектральных типов колбочек и палочек рыбы данио рерио с наложенным спектром предъявляемого светового стимула.

Результаты. Для всех спектральных типов колбочек мы анализировали возможные эффекты повышения уровня цАМФ (под действием форсколина) на такие параметры фотоответов, как темновой ток, чувствительность колбочек к свету, определяемые по кривым ответ-интенсивность или по полунасыщенным ответам, кинетику включения и выключения ненасыщенного фотоответа, время интегрирования.

Типичные результаты, зарегистрированные нами для изолированных зеленочувствительных колбочек показаны на рис. 2. При сравнении нормированных ответов на насыщающую вспышку, зарегистрированных в нормальном растворе Рингера и после воздействия 10 мкМ форсколина, было выявлено статистически значимое повышение чувствительности (которое определяли по амплитуде нормированного

ответа (рис.2 А)), замедление нисходящей фазы ответа (рис. 2В), увеличение времени интегрирования (рис. 2Г); в то же время повышение уровня цАМФ не оказывало значимого влияния по сравнению с контрольными экспериментами на такие параметры как скорость активации каскада (крутизна восходящей фазы фотоответа (рис. 2Б) и величина темнового тока (данные не показаны).

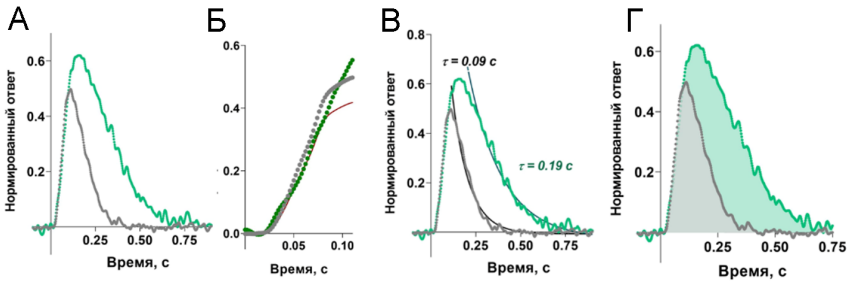


Рис. 2. Влияние повышения внутриклеточного уровня цАМФ (вызываемого форсколином) в зеленочувствительных колбочках рыб данио рерио. На графиках серые кривые показывают ответы в нормальном растворе Рингера, зеленые кривые – ответы после 20 минут инкубации в нормальном растворе Рингера с 10 мкМ форсколина. А – влияние форсколина на ненасыщенный ответ зеленочувствительных колбочек (λ_{max} = 460 нм, 1,4×102 фотонов/мкм^2). Б – сравнение восходящих фаз ответа в нормальном растворе Рингера и при действии форсколина. Е – сравнение скорости выключения фотоответа в растворе Рингера и при действии форсколина, оцениваемое путем подгонки экспоненциальной функцией. Г – анализ времени интегрирования ответа в растворе Рингера и при действии форсколина.

Анализ эффектов форсколина на синечувствительные изолированные колбочки данио рерио выявил сходные результаты – статистически значимое замедление выключения ответа и увеличение времени интегрирования и чувствительности при неизменной скорости активации каскада и сохранении амплитуды темнового тока (данные не показаны).

Оценка влияния повышенного уровня цАМФ на изолированные красночувствительные колбочки показала, что красночувствительные колбочки реагируют на такое воздействие несколько по-другому. С одной стороны, исходно в нормальных условиях имеют еще более быстрые ненасыщенные ответы, чем зеленочувствительные колбочки данного вида, а замедление выключения под действием форсколина более выраженное (увеличение постоянной времени нисходящей фазы под действием форсколина достигает у некоторых клеток достигает нескольких раз

(рис. 3А). С другой стороны, такое существенное замедление выключения фотоответа не сопряжено со статистически значимым увеличением чувствительности по сравнению с контрольными экспериментами. Этот паттерн реакции красночувствительных колбочек на форсколин был подтвержден и в экспериментах *ex vivo* ЭРГ с выделением ответа красночувствительных колбочек (рис. 3Б). Можно было бы ожидать, что условия эксперимента в данном случае несколько иное, колбочки сохраняют связь с нижележащими слоями сетчатки, что ближе к витальной ситуации, кроме того, форсколин в таком эксперименте свободно воздействует непосредственно на наружные сегменты колбочек; тем не менее результаты инкубации красночувствительных колбочек с форсколином в значительной степени сходны для указанных двух экспериментальных подходов.

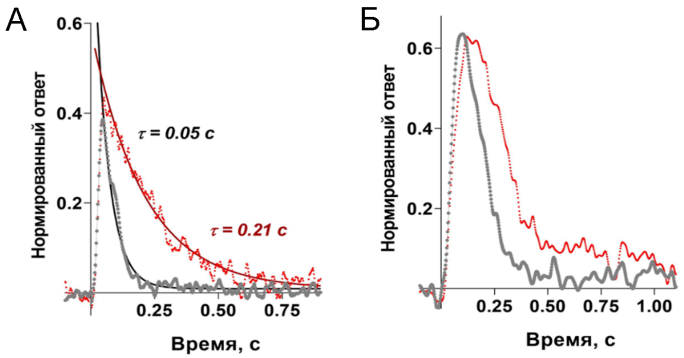


Рис. 3. Влияние повышения внутриклеточного уровня цАМФ в красночувствительных колбочках рыб данио рерио. На графиках серые кривые показывают ответы в нормальном растворе Рингера, красные кривые – ответы после 20 минут инкубации в нормальном растворе Рингера с 10 мкМ форсколина. А – влияние форсколина на ненасыщенный ответ красночувствительных колбочек, зарегистрированный методом всасывающей пипетки от изолированной красночувствительной колбочки. Б – влияние форсколина на суммарный ненасыщенный ответ красночувствительных колбочек, зарегистрированный методом *ex vivo* ЭРГ.

Обсуждение. В настоящей работе мы исследовали возможное регуляторное влияние повышения внутриклеточного уровня цАМФ на работу каскада фототрансдукции в колбочках рыб данио рерио разных спектральных типов. Основным эффектом повышения цАМФ для всех трех типов колбочек (зелено-, сине- и красночувствительных) является замедление процессов выключения фотоответа. Этот эффект выражен в разных типах колбочек в разной степени, однако во всех случаях

статистически значим и обнаруживается при применении разных экспериментальных подходов. Замедление выключения фотоответа хорошо согласуется с данными о предполагаемой основной мишени цАМФ в каскаде фототрансдукции: киназе G-белок-сопряженного рецептора (GRK), которая инактивирует зрительный пигмент после его возбуждения светом, благодаря чему в колбочках в принципе возможно быстрое выключение ответа и типичное для этого типа фоторецепторов быстродействие [4]. По-видимому, цАМФ регулирует фосфорилирование GRK через свой эффектор – протеинкиназу А.

Интересное наблюдение в нашей работе состоит в том, что замедление выключения фотоответа приводит к повышению чувствительности к свету у сине- и зеленочувствительных колбочек (как мы ранее это наблюдали в палочках), но не в красночувствительных колбочках. Вероятно, такое различие в суммарных эффектах могло быть связано с различной регулировкой их работы в суточной ритмике.

Финансовая поддержка: грант № РНФ 24-25-00260.

ЛИТЕРАТУРА

1. Astakhova LA, Samoiliuk EV, Govardovskii VI, Firsov ML. cAMP controls rod photoreceptor sensitivity via multiple targets in the phototransduction cascade. Journal of General Physiology. 2012 Oct 1;140(4):421-33.
2. Chernyshkova O, Erofeeva N, Meshalkina D, Balykina A, Gambaryan S, Belyakov M, Firsov M. Light induces a rapid increase in cAMP and activates PKA in rod outer segments of the frog retina. Journal of General Physiology. 2024 Oct 22;156(11):e202313530.
3. Ситникова ВС, Астахова ЛА, Фирсов МЛ. Особенности цАМФ-зависимой регулировки каскада фототрансдукции в колбочках. Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 2020:106(4), pp.448-461. DOI: 10.31857/S0869813920040081
4. Chrispell JD, Xiong Y, Weiss ER. Grk7 but not Grk1 undergoes cAMP-dependent phosphorylation in zebrafish cone photoreceptors and mediates cone photoresponse recovery to elevated cAMP. Journal of Biological Chemistry. 2022;298(12). DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102636
5. Baylor DA, Lamb TD, Yau KW. The membrane current of single rod outer segments. J. Physiol. 1979;288:589-611.
6. Nikolaeva DA, Nekrasova MA, Rotov AY, Astakhova LA. Adaptation memory in photoreceptors: different mechanisms in rods and cones. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2023 Apr 24;16:1135088.

НЕКОТОРЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ФОРМЫ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК КОЖИ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

Кандалова О.В.[1], Ляпон А.О.[1], Елистратова И.В.[2]

[1]ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» МЗ РФ,
кафедра кожных и венерических болезней, Москва, Россия
[2]ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», Балашиха, Московская область, Россия

Молекулярные шапероны – белки теплового шока (HSP), играют роль во многих физиологических процессах в клетке, регулируют фолдинг вновь синтезированных пептидов и первоначальный фолдинг белков в нативные формы, способствуют деградации повреждкнных белков и агрегированных белковых комплексов, регулируют гомеостаз белков и т.д. Суперсемействе HSP классифицируется на основании их молекулярной массы, в семейство HSP90 входят белки HSP90α, HSP90β, GRP94, TRAP1 [1]. Hsp90α и Hsp90β экспрессируются во всех типах клеток, но не заменяют друг друга в биологических функциях, Hsp90α выполняет экстраклеточные функции в условиях стресса, а Hsp90β – нет. В нетрансформированных клеточных линиях самая низкая экспрессия Hsp90 составляет <2%, а самая высокая ~9% [2]. В клетках млекопитающих белки семейства HSP90 индуцируются при стрессе, они регулируют фолдинг ~10% цитозольных белков, необходимы для функционирования большого количества клиентских белков, поддерживают дифференцировку, клеточную стабильность, гомеостаз и адаптацию клеток.

Особый интерес вызывает роль HSP в патогенезе заболеваний, в частности, атопического дерматита (АД). АД является одним из наиболее распространенных в мире хронических воспалительных рецидивирующих заболеваний кожи, характеризующихся экзематозными поражениями кожи. Воздействие загрязняющих веществ окружающей среды влияет на экспрессию генов, которые контролируют целостность эпителиального барьера кожи, и запускает патологический иммунный ответ, увеличивая заболеваемость и распространенность АД. Как внутриклеточная, так и экстраклеточная формы Hsp90 участвуют в модуляции иммунного ответа в коже человека. Циркулирующие экстраклеточнаые белки Hsp90 играют роль в обострении АД [3]. Уровень Hsp90 в сыворотке крови пациентов с АД, а также IgE аутоантитела к белкам Hsp90, значительно повышены по сравнению со здоровыми лицами. Серопозитивность по анти-Hsp90 IgE выявлена у 48,27% пациентов с АД по сравнению с 2,85% у здоровых лиц. Установлена положительная корреляция между уровнем Hsp90 в

сыворотке крови и тяжестью АД по индексу SCORAD [4]. Повышенная экспрессия HSP90 представляет собой адаптацию к воспалительному повреждению тканей, связанному с АД.

При повреждении кожи происходит резкое увеличение Hsp90 внутри раневого канала. Экстраклеточный и внутриклеточный белки HSP90 участвуют в заживлении ран и в развитии фиброза тканей посредством регуляции функций фибробластов. Повышение экспрессии HSP90 увеличивает синтез коллагена фибробластами, что зависит от сигнального пути TGF -β, Smad 2/3 и Akt. Экспрессия HSP90 повышена в келоидной ткани по сравнению с нормальной тканью кожи [5].

В патогенезе воспалительных заболеваний кожи играет роль взаимодействие кератиноцитов с клетками иммунной системы, включая Th17. В клеточной линии кератиноцитов HaCaT при стимуляции IL-17 транскрипционно активируются хемокины CXCL1, CXCL5 и CXCL8, а также β-дефензин 1, белки S100A8 и S100A9. Act1 является клиентским белком HSP90 и, при этом, участвует в сигнальном пути IL-17. Связывание Act1 с HSP90α значительно увеличивалось в присутствии IL-17. В кератиноцитах ингибирования HSP90 влияло на экспрессию цитокинов и антимикробных пептидов, опосредованную IL-17 [6].

HSP90 поддерживает функцию многих провоспалительных клиентских белков. Ингибирование HSP90 может быть механизмом действия при воспалительных заболеваниях кожи, в том числе, при АД. В первичных кератиноцитах человека ингибитор HSP90 - RGRN-305, подавлял экспрессию генов цитокинов *TNF, Il1b, Il4, Il6, Il13, TSLP* и генов хемокинов *CCL17, CCL22*, связанных с АД, нарушал сигнализацию JAK-STAT, подавляя активность STAT3 и STAT6. Местный или пероральный прикм ингибитора RGRN-305 подавлял воспаление кожи у мышей в модельной системе АД, уменьшая отек и эритему кожи и инфильтрацию иммунных клеток в кожу (Т-лимфоциты, нейтрофилы, тучные клетки). Топический прикм RGRN-305 показал аналогичную эффективность по сравнению с дексаметазоном [7].

Высвобождение HSP90 из клеток может инициировать иммунный ответ после взаимодействия HSP с антиген-презентирующими клетками (APC). HSP фагоцитируются APC, далее в эндосомах происходит протеолиз белка до пептидов, затем презентация этих пептидов молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) 1-го класса на поверхности APC. Комплексы Hsp90-пептид могут быть представлены дендритными клетками, после чего иммунизация комплексами Hsp90-пептид вызывает Ag-специфический ответ Т-клеток. Это имеет отношение к влиянию белков теплового шока на иммунный ответ в тканях [8].

Интересные исследования касаются взаимодействия экстраклеточных форм Hsp90, секретируемых бактериями или

микроскопическими патогенными грибами, колонизирующими кожу человека, с клетками кожи и клетками иммунной системы организма - хозяина. Например, грибы *Malassezia sympodialis*, которые колонизируют кожу человека, секретируют HSP 86 kDa. Уровень контаминации этими грибами при АД в несколько раз превосходит этот показатель у здоровых людей. Hsp90 является ключевым фактором вирулентности патогенных грибов, играя важную роль в формировании лекарственной устойчивости. Внутриклеточный Hsp90 патогенных грибов может секретироваться как экстраклеточная форма Hsp90, что играет решающую роль в инвазии грибковых инфекций. Экстраклеточные формы Hsp90 также могут быть фагоцитированы антиген-презентирующими клетками и представлены на их поверхности, что модулирует иммунный ответ на антигены грибов [9].

Рецептором для экстраклеточного белка HSP90, как и для ряда других белков теплового шока, является CD91/LRP1 (endocytic low-density lipoprotein receptor-related protein). Лигандами CD91 также являются другие белки, в том числе, активатор плазминогена тканевого типа, α2-макроглобулин, растворимый клеточный прионный белок и т.д.. многие из которых активируют клеточную сигнализацию. Для активации необходимого сигнального пути используются специфические ко-рецепторы и адаптеры. Кроме того, обязательным условием проведения сигнала от CD91 является наличие липидных рафтов [10].

Экспрессия CD91 на дендритных клетках необходима для генерации ответов Т-лимфоцитов и NK-клеток. Связывание CD91 с экстраклеточным HSP90 на дендритных клетках инициирует сигнальный путь, сопряжкнный с секрецией цитокинов. В этом случае адаптерными киназами являются AXL и Fgr, которые связываются с CD91 и фосфорилируют его [11].

Экстраклеточный HSP90, секретируемый фибробластами, связывается с рецепторами CD91на макрофагах и инициирует их М2 поляризацию. В данном случае ко-рецептором является рецептор TLR4. В сигнальный путь входят киназа IRAK1, фактор MyD88, они активируют сигнальный путь CD91/MyD88- IRAK1/JAK2/TYK2-STAT-3/4-IKKα/β-NF-κB/IRF3 (фактор регуляции интерферона 3). Этот сигнальный путь необходим для экспрессии генов, ассоциированных с М2 фенотипом макрофагов (*CD163, CD204, IL-10*), а также для снижения уровня экспрессии воспалительных цитокинов М1 [12].

При травмах экспрессия рецептора CD91 на моноцитах изменяется. Экспрессия моноцитов с фенотипом CD14+CD91$^{low/neg}$ является маркером острых воспалительных заболеваний, они повышаются при этом в 15 раз (моноциты с воспалительным фенотипом CD14+CD16+ увеличиваются в 5 раз). По сравнению с другими субпопуляциями моноциты с фенотипом CD14+CD91^{low} имеют существенно более низкую плотность экспрессии

антигенов HLA-DR, достоверно сниженную экспрессию рецепторов CD300e, высокие уровни миелопероксидазы, повышенную фагоцитарную активность и способность генерировать супероксидный анион [13].

Экспрессия рецептора CD91 на моноцитах достоверно повышается при заболеваниях кожи, в частности, при витилиго и псориазе. CD91 также экспрессируется на антиген-презентирующих клетках, что активирует аутореактивные CD8+ Т-клетки [14].

Хотя антиген-презентирующие клетки обычно экспрессируют схожие уровни рецептора HSP CD91, имеется дифференцированная сигнализация, связанная с сигналами STAT1. В результате этой дифференцированной сигнализации макрофаги, но не дендритные клетки, активированные HSP90, способны активировать NK-клетки для выработки IFN-γ. Эти указывает на то, что различные типы антиген-презентирующих клеток активируют уникальные внутриклеточные сигнальные пути в ответ на HSP, которые приводят к активации различных субпопуляций лимфоцитов, что играет роль в патогенезе атопического дерматита. Это указывает на особую роль экстраклеточных форм HSP90, которые имеют значение для иммунного ответа при заболеваниях кожи, в том числе, при атопическом дерматите [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gu J., He Y., He C. et al. // Signal Transduct. Target Ther. 2025; 10(1):84-91.
2. Chang C., Tang X., Woodley D. et al. // Cells. 2023; 12(2):277-283.
3. Tukaj S. // Cell. Stress Chaperones. 2022; 27(6):601-602.
4. Sitko K., Bednarek M., Mantej J. et al. // Cell. Stress Chaperones. 2021; 26(6):1001-1007.
5. Lee S., Lim A., Rah D. et al. // Tissue Cell. 2016; 48(6):616-623.
6. Kim B., Park M., Kim J. et al. // Int. J. Mol. Med. 2016; 38(2):650-658.
7. Ben Abdallah H., Bregnhøj A., Ghatnekar G. et al. // Front. Immunol. 2024; 14:1289788.
8. Kurotaki T., Tamura Y., Ueda G. et al. // J. Immunol. 2007; 179(3):1803-1813.
9. Fang T., Lu H., Jiang Y. // Eur. J. Pharm. Sci. 2025; 207:107041.
10. Mantuano E., Azmoon P., Banki M. et al. // Sci. Rep. 2022; 12(1):17594.
11. Harkness J., Nayak D., Sedlacek A. et al. // Cell. Commun. Signal. 2024; 22(1):598-605.
12. Fan C., Chen C., Chen L. et al. // Cells. 2022; 11(2):229-234.
13. Gosset C., Foguenne J., Simul M. // Clin. Chem. Lab. Med. 2024; 62(7):1438-1449.
14. Piquero-Casals J., Martínez-Martínez L., Alomar A. et al. // Exp. Dermatol. 2021; 30(3):390-395.
15. Sedlacek A., Kinner-Bibeau L., Wang Y. et al. // Sci. Rep. 2021; 11(1):16106.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA* (PLATYHELMINTHES)

Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д.

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Плоские черви – одна из первых групп животных, у которых появились специализированные системы тканей и органов: нервная система ортогонального типа; пищеварительная система с глоткой и разветвленной кишечной полостью, мышечная система, состоящая из трехслойного кожно-мускульного мешка [1]. В его состав входят: наружный слой кольцевой мускулатуры, внутренний слой продольной мускулатуры и соединяющий их промежуточный слой диагональной мускулатуры, осуществляющий процесс синхронизации движений кольцевой и продольной мускулатуры. Мускулатура плоских червей выполняет несколько функций: локомоции, захвата и удержания пищи, поддержания постоянной формы тела животного, защиты подлежащих органов и тканей [2]. Мышечная ткань у плоских червей может выполнять дополнительные функции, связанные с образом жизни, например, у паразитических видов – удержание паразита в организме-хозяине или участие в процессах полового и бесполого размножения. Кроме того, мускулатура паразитических червей является мишенью действия антипаразитарных препаратов [3]. Большое количество функций делает мышечную ткань плоских червей важным объектом для изучения. Для этого последние 20 лет используют флуоресцентно-меченный фаллоидин, при окраске которым гистологические препараты дают отчетливые изображения, позволяющие делать выводы об особенностях строения мышечной ткани этих животных [4,5].

Представители плоских червей, планарии, обладают высокими регенерационными способностями и используются в качестве модельного объекта для изучения регенерации [6]. Задачей настоящего исследования стало изучение и описание процесса регенерации мускулатуры в головном отделе тела после его декапитации у планарий *Girardia tigrina* (Dugesiidae, Platyhelminthes) с целью определить его морфологические и временные особенности.

Материалы и методы. Особям размером около 7 мм отсекали головной конец и оставляли регенерировать при температуре 20-21°C. Из группы регенерирующих животных на каждую временную точку – на 3, 5, 7, 10 и 13-й дни отобрали по 7 особей для фиксации. Дополнительно была отобрана контрольная группа (8 особей) для сравнения степени

регенерации головного отдела тела (рис. 1А) у подопытных и интактных животных.

Червей фиксировали в 4% растворе параформальдегида под покровным стеклом в течение 1 ч при 20°С. Далее образцы переносили в пробирку со свежим раствором 4% параформальдегида на 4 ч при температуре 4°С. Промывали в 0.1 М PBS, затем помещали в раствор TRITC-меченого фаллоидина (1:200) на 6 ч при комнатной температуре. Промывали PBS три раза. Тотальные препараты планарий помещали на предметные стекла, заключали в каплю (~60 мкл) 75% глицерина на PBS и накрывали покровным стеклом. Готовые образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica, Германия). Для выявления фаллоидина был применен флуоресцентный фильтр N2.1 (спектр возбуждения 515-560 нм, спектр испускания 590 нм).

Результаты. Окрашивание фаллоидином позволило визуализировать актиновые филаменты мускулатуры тела у интактных (рис. 1Б) и регенерирующих планарий (рис. 1В). Наблюдения проводили на 3-13 дни регенерации.

На 3 день на раневой поверхности формируется регенерационная бластема, состоящая из недифференцированных стволовых клеток, необластов. Вблизи участка раневой поверхности (в постбластеме) обнаруживаются скопления слабо окрашиваемых (по сравнению с неповрежденным участком тела животного) клеток. Предположительно, это – дифференцирующиеся по пути мышечных клеток миобласты. Миобластами называются необласты, начавшие дифференциацию, приводящую в дальнейшем к специализации в клетки мышечной ткани, но находящиеся еще на самом раннем этапе клеточной линии. В ряде препаратов видны не оформившиеся рыхлые окрашиваемые фаллоидином структуры.

На 5-й день регенерации в области бластемы некоторые клетки окрашиваются фаллоидином крайне интенсивно, а их общее число значительно увеличивается. Это может говорить о процессах дифференцировки неспециализированных необластов в миобласты. На некоторых препаратах отчетливо видны миофибриллоподобные структуры – так называемые «направляющие оси», которые начинаются от неповрежденного участка тела, близкого к бластеме, и длятся на протяжении большей части бластемы, сходясь в одной точке (апикальной). Роль «направляющих осей» предположительно заключается в создании каркаса для регенерации мышечной ткани – в направлении протяженности «направляющих осей» происходит рост популяции миобластов.

Интенсивность окраски мышечных структур (как клеток, так и «направляющих осей») достигает своего пика на 7 день регенерации, что говорит о повышенном синтезе актина. Отчетливо видны окрашенные

миобласты и мышечные клетки. К этому времени закладка мускулатуры в области головной бластемы практически завершена. До сих пор сохраняются «направляющие оси», поддерживающие направление роста миобластов. На некоторых препаратах обнаруживаются слабо окрашиваемые паттерны внутреннего слоя мышечной ткани (продольной) – очевидно, внутренний слой мускулатуры планарии восстанавливается раньше его остальных компонентов. Заметны регенерирующие глаза.

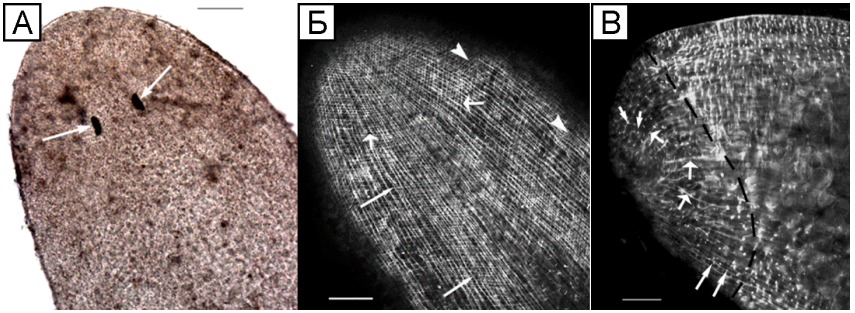


Рис. 1. Окраска фаллоидином (серым) мускулатуры тела планарий *G. tigrina,* тотальные препараты. А – 10-й день регенерации, регенерировавший головной конец, световая микроскопия, глаза (стрелки); Б – мускулатура головного конца тела интактной планарии, продольные (длинные стрелки), диагональные (тупые стрелки) и тонкие кольцевые мышечные волокна (острия стрелок), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, оптический срез; В – 5-й день регенерации, граница регенерационной бластемы (обозначена пунктиром), направляющие оси (тупые стрелки), продольные мышечные волокна (длинные стрелки), дифференцирующиеся миобласты (короткие тонкие стрелки). Масштаб 100 мкм.

На 10 день «направляющие оси» теряют интенсивность окраски. Предположительно они редуцируются в связи с завершением процесса дифференцировки миобластов и их трансформации в клетки мышечной ткани. Новообразованные клетки мышечной ткани, переходят к завершающему этапу дифференцировки в зрелые мышечные клетки. Повышается интенсивность окраски внутреннего продольного мышечного слоя; кольцевая мускулатура внешнего слоя мускулатуры, а также соединяющие их диагональные волокна интенсивно окрашены. Отчетливо видны восстановившиеся глаза.

На 13 день участок регенерирующий головной участок тела планарии окрашивается фаллоидином с такой же интенсивностью, как и неповрежденный участок тела. На участке регенерационной бластемы и в районе его перехода в неповрежденный участок тела периодически видны отдельные клетки, выделяющиеся яркой окраской фаллоидином.

Предположительно, эти клетки завершают свою специализацию в зрелые клетки мышечной ткани. Вспомогательные структуры практически полностью редуцированы, увидеть их остатки можно только на отдельных препаратах. Отчетливо видны восстановленные слои мускулатуры тела, как внутренние продольные, диагональные, так и наружные кольцевые. Глаза полностью сформированы.

Заключение. Результатом проведенной работы стало описание морфологических изменений и установление сроков регенерации мускулатуры тела в головном конце *G. tigrina*.

В первые дни после отсечения головного конца тела наблюдается отсутствие окрашенных мышечных клеток в формирующейся регенерационной бластеме. Появление клеток-предшественниц мышечной ткани (миобластов) наблюдается на 3-5 дни регенерации. На 5-7 дни интенсивность окраски миобластов повышается, а их общее число – увеличивается, указывая на более продвинутую стадию их дифференцировки. Образуются так называемые «направляющие оси», берущие начало в старых тканях и простирающиеся к апикальному концу тела животного. Интересно, что в направлении этих «осей» с 7-го по 10-й дни регенерации происходит дальнейший рост популяции миобластов. Интенсивность окрашивания клеток вновь образующейся мышечной ткани увеличивается с 5 по 10-й дни. После достижения пика интенсивности, можно говорить о снижении активности клеточной дифференцировки. В последние дни (10-13 дни) мышечные клетки регенерировавшей головной части тела червей окрашены с такой же интенсивностью, как и клетки неповрежденного участка тела.

Полученные данные сравнимы с полученными нами ранее в отношении планарий *P. tenuis* [7]. Результаты работы указывают на то, что, несмотря на различную степень родства, и особенностей физиологии у планарий (половой или бесполый способ размножения; способ питания), процесс регенерации мышечной ткани у *P. tenuis* и *G. tigrina* протекает по сходному паттерну. Ключевым различием в процессе регенерации у *P. tenuis* и *G. tigrina*, является время, требуемое для восстановления мускулатуры после ее повреждения до исходного состояния. Мускулатура головного конца *P. tenuis* хотя и сформирована в определенной степени к 13 дню, однако полная регенерация головного конца все еще не завершена. В то время как, что при тех же экспериментальных условиях регенерация мускулатуры у планарий *G. tigrina* занимает 10-13 дней, к этому времени наблюдается практически полное восстановление мышечной ткани до ее исходного состояния. Предположительно, временные различия при схожих морфологических стадиях процесса регенерации могут быть объяснены разницей в анатомическом строении данных видов, а также видовыми особенностями – скоростью регенерации, присущей конкретному виду планарий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Collins JJ. Platyhelminthes. *Current Biology*. 2017;27(7): R252-R256.
2. Mair GR, Maule AG, Shaw C, Halton DW. Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitology Today*. 1998;14(2): 73-76.
3. Terenina NB, Kreshchenko ND, Movsesyan SO. Musculature and neurotransmitters of internal organs of trematodes (the digestive, reproductive and excretory systems). *Zoology*. 2022;150: 125986.
4. Cebria F. Planarian body-wall muscle: regeneration and function beyond a simple skeletal support. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2016;4(8): 1-8.
5. Kreshchenko ND. Some details on the morphological structure of planarian musculature identified by fluorescent and confocal laser-scanning microscopy. *Biophysics*. 2017;62(2): 271-277.
6. Tiras Kh, Mestetsky L, Nefedova S, Lomov N. Registration of regeneration in planarians from photographic images. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. 2021;7(3): 030303.
7. Кузнецов ГВ, Крещенко НД. 2024. Регенерация мускулатуры тела у планарий *Polycelis tenuis*. *Биофизика*. 2024;69(6) :1291-1299.

ДИНАМИКА МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У ПЛАНАНИЙ *GIRARDIA TIGRINA* В ПРИСУТСТВИИ СЕРОТОНИНА И МЕЛАТОНИНА

Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

Введение. Планарии характеризуются высокой регенерационной способностью – данные животные способны восстановить утраченную голову за несколько дней. Регенерацию планарий обеспечивают необласты – особые стволовые клетки, которые, проходя последовательно через стадии размножения, роста и дифференциации, замещают утраченную структуру планарии (эпиморфный тип регенерации). Хотя определенный процент необластов функционирует в организме планарий постоянно, при повреждении животного происходит их активация, что в свою очередь приводит к увеличению числа клеток, находящихся в митозе.

Настоящая работа направлена на изучение цитологических особенностей процесса регенерации у планарий *Girardia tigrina* при нормальных условиях, а также в присутствии нейромедиатора серотонин и гормона мелатонина.

Проводимые ранее исследования продемонстрировали наличие данных веществ в организме интактных планарий [1-3]. Серотонин – производное аминокислоты триптофан, подвергшейся гидроксилированию и карбоксилированию. В организме высших животных он выполняет функции нейротрансмиттера. Серотонин был обнаружен в структурах нервной системы планарий [1,2]. Имеются предварительные данные о том, что серотонин благоприятно влияет на процесс регенерации отдельных частей тела червей, ускоряя его [4]. В организме высших животных серотонин, подвергаясь метилированию, трансформируется в мелатонин. Роль мелатонина хорошо изучена в организме высших животных (регуляция циркадного ритма, поведенческая регуляция), однако сведения о функциях данного гормона в организме низших животных (плоских червей) немногочисленны и нуждаются в дальнейшем развитии [5].

В настоящем исследовании рассматривалось изменение числа делящихся клеток (митотический индекс, MI) в процессе регенерации. На основе полученных данных о изменении величины MI во время регенерации при нормальных условиях, а также в присутствии серотонина

и мелатонина, были сделаны выводы о влиянии данных веществ на процесс регенерации у планарий.

Материалы и методы. Планарий *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria) содержали в затемненных условиях в смеси водопроводной и дистиллированной воды (2:1) (стандартный раствор для содержания планарий) при 20 ± 1ºС, кормили один раз в неделю. За 7 дней до опыта кормление прекращали. Отбирали животных длиной около 9 мм.

Было проведено 2 серии опытов. Каждая серия опытов состояла из 2 экспериментов. Первую серию опытов составили: контрольная группа и группа серотонина. Вторую серию опытов составили: контрольная группа и группа мелатонина. Каждая группа состояла из 70 особей. За три дня до начала эксперимента планарий подопытной группы помещали в раствор исследуемого вещества. Планарии контрольной группы были помещены в 150 мл стандартного раствора содержания планарий. Планарии группы серотонина были помещены в 150 мл раствора серотонина в концентрации 10^{-6}М. Планарии группы мелатонина были помещены в 150 мл раствора мелатонина в концентрации 10^{-6}М. Через три дня преинкубации с серотонином (или мелатонином, соответственно группе) планариям проводили резекцию головного отдела. Каждой особи проводили декапитацию и перемещали в стеклянный стакан с 150 мл свежего раствора серотонина (или мелатонина, соответственно группе) в концентрации 10^{-6} М. На 0-й (т.е. сразу после отсечения головного отдела), 1, 2, 3, 5, 7 и 10-й дни регенерации от каждой группы отбирали по десять особей на каждую временную точку. У регенерирующих планарий отсекали участок регенерационной бластемы в головном отделе тела. Контролем служили фрагменты тканей, отсеченные на границе предварительно отсеченного головного участка тела в 0-й день. Полученные образцы тканей лизировали до диссоциации на отдельные клетки; далее вносили флуоресцентный краситель Hoechst 33342, связывающийся с ДНК; после окрашивания в суспензию клеток вносили фиксатор. Полученную клеточную суспензию наносили на предметное стекло. Исследования проводили методом флуоресцентной микроскопии посредством микроскопа Leica DM6000B. Из каждой пробы готовили по 4 препарата. На каждом из четырех стекол подсчитывали около 1000 окрашенных ядер. Фаза митоза, в которой находилась клетка в момент фиксации, определялась визуально, под микроскопом, по характерным признакам окрашенных ДНК-содержащих структур. Результатом исследования стали вычисленные значения митотического индекса на ~1000 клеток в исследуемом препарате.

Митотический индекс высчитывался по формуле:

$$\mathrm{MI} = \frac{(P + M + A + T)}{N} * 100$$

где: N – общее число рассмотренных клеток; *P, M, A, T* – число наблюдаемых профаз, метафаз, анафаз и телофаз соответственно.

Результаты. Результаты представлены как среднее значение от результатов двух экспериментов одной серии опытов. Динамика изменения MI в ходе регенерации головного конца планарии *G. tigrina* при нормальных условиях, в присутствии серотонина и в присутствии мелатонина указана на графиках, изображенных на рис. 1, рис. 2 и рис. 3.

Нормальные условия (Контроль) (рис. 1-3). На 1-й день регенерации значение MI увеличивается относительно значения MI 0-го дня. На 2-й день регенерации значение MI снижается, не доходя до значения MI 0-го дня. На 3-й день регенерации величина MI снова увеличивается, достигая своего максимального значения в ходе регенерации. На 5 и 7-й дни регенерации наблюдается плавное снижение величины MI. На 10-й день регенерации величина MI становится максимально приближенной к значениям 0-го дня.

Серотонин 10^{-6} M (рис. 1, 3). На 0-й день наблюдаемое значение MI выше, чем у образцов контрольной группы. На 1-й день регенерации величина MI незначительно увеличивается относительно величины 0-го дня. На 2-й день, в отличие от регенерации в нормальных условиях, величина MI не снижается, но незначительно увеличивается. На 3-й день регенерации величина MI снижается до уровня 0-го дня регенерации. На 5 и 7-й дни наблюдается плавное снижение величины MI до значений ниже величины 0-го дня. На 10-й день регенерации величина MI достигает своего минимального значения, приближаясь к величинам, характерным для 0-го и 10-го дней контрольной группы планарий (регенерирующих в нормальных условиях), но все еще превышая их.

Мелатонин 10^{-6} M (рис. 2, 3). На 0-й день наблюдаемая величина MI выше, чем у образцов контрольной группы, но ниже, чем у группы серотонина. На 1-й день величина MI увеличивается; увеличение выражено ярче, чем у группы серотонина, но слабее, чем у контрольной группы. На 2-й день наблюдается незначительное увеличение значения MI. На 3-й день значение MI также увеличивается, достигая максимальной величины. На 5 и 7 дни регенерации наблюдается резкое снижение значения MI, которое опускается ниже значений 0-го дня. На 10-й день величина MI достигает своего минимального значения, приблизительно равного величине MI для 0 и 10 дней контрольной группы планарий (регенерирующих в нормальных условиях).

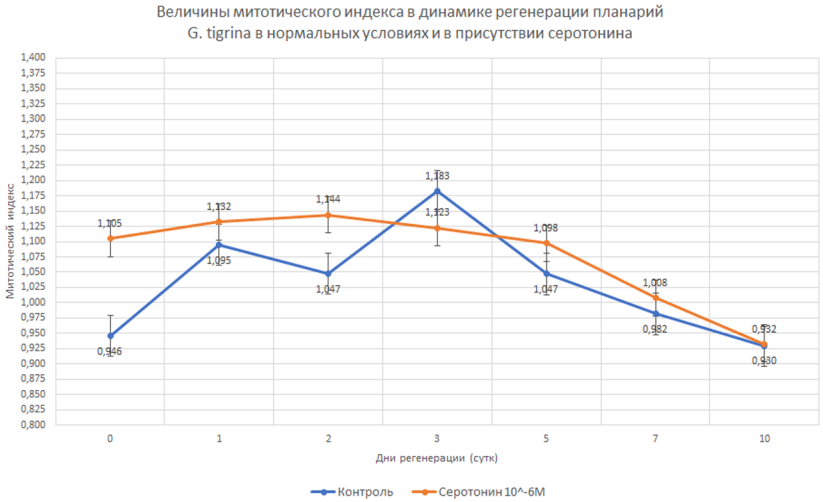


Рис. 1. График изменения величины MI в процессе регенерации головного конца планарий *G. tigrina* в присутствии серотонина.

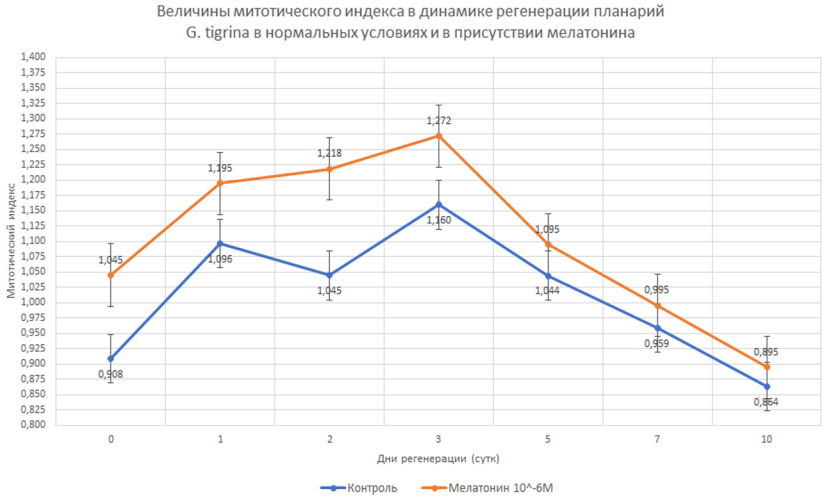


Рис. 2. График изменения величины MI в процессе регенерации головного конца планарий *G. tigrina* в присутствии мелатонина.

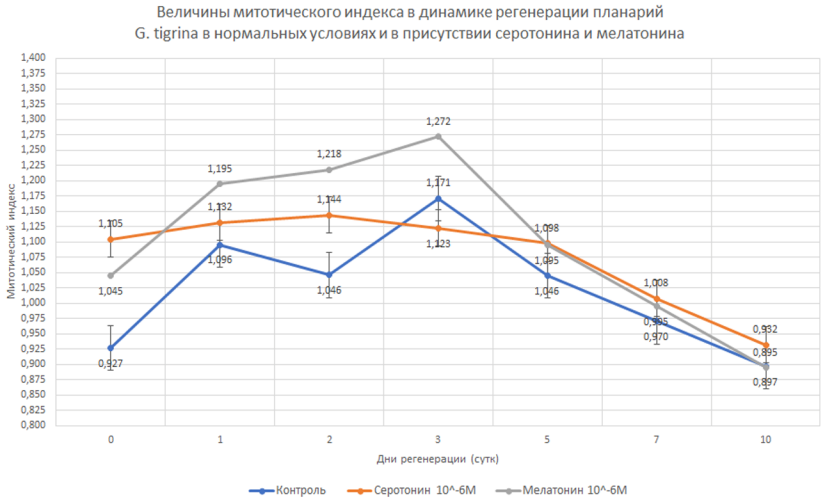


Рис. 3. Сводный график изменения величины MI в процессе регенерации головного конца планарий *G. tigrina* в различных условиях.

Табл. 1. Величины MI в разные дни процесса регенерации головного конца планарий *G. tigrina* в различных условиях.

Условия регенерации	Дни регенерации						
	0	*1*	*2*	*3*	*5*	*7*	*10*
Нормальные условия	0,927	1,096	1,046	1,171	1,046	0,970	0,897
Серотонин 10^{-6} М	1,105	1,132	1,144	1,123	1,098	1,008	0,932
Мелатонин 10^{-6} М	1,045	1,195	1,218	1,272	1,095	0,995	0,895

Выводы. Серотонин и мелатонин оказали позитивное влияние на процесс регенерации головного конца планарий *G. tigrina*. В присутствии обоих веществ у планарий *G. tigrina*, число клеток, находящихся в митозе, увеличивается по сравнению с животными, регенерирующими в нормальных условиях. Повышенное по сравнению с нормальными условиями (содержание в стандартном растворе) количество митотических клеток наблюдается у планарий уже в 0-й день, т. е. после трех дней преинкубации в серотонине или мелатонине.

Это может указывать на чувствительность необластов планарий к исследуемым веществам – серотонину и мелатонину (ряда биохимического превращения триптофана до мелатонина). Можно

предположить, что необласты имеют специфические рецепторы, связанные с веществами данного ряда. Активация этих рецепторов, вероятно, приводит к повышению интенсивности клеточных процессов и клеточной жизнедеятельности, и увеличению числа митотических клеток.

Однако воздействие серотонина и мелатонина на процесс регенерации было разным. Исходя из полученных значений MI и вида построенных графиков, можно выдвинуть гипотезу о природе влияния исследуемых веществ на процесс регенерации. Можно предположить, что серотонин увеличивает резерв необластов у планарии, и приводит к более стабильному характеру протекания процесса регенерации, поскольку наблюдаемое на графике (рис. 1) изменение MI носит плавный характер. Повышенное значение величины MI на 10-й день регенерации в подопытной группе по сравнению с контрольными (рис. 3), может указывать на аккумуляцию эффекта серотонина в организме планарий. При изучении влияния мелатонина, который также увеличивал количество необластов на 1, 2 и 3-й дни регенерации наблюдали более высокие значения MI по сравнению с контрольным (0-м) днем. Однако, после третьего дня наблюдается резкое падение величины MI, а на 10-й день регенерации величина MI становится приближенной к таковой у животных, регенерировавших в нормальных условиях (рис. 2). Это может говорить о том, что стимулирующее действие мелатонина проявляется в период наиболее активного периода регенерации, не аккумулируясь в организме планарий.

Заключение. Исследование клеточной суспензии в ходе регенерации головного конца планарий *Girardia tigrina* в разные дни регенерации показало, что серотонин и мелатонин положительно влияют на величину митотического индекса (т.е. числа клеток, находящихся в митозе), что может говорить об ускорении протекания процесса регенерации. Являясь веществами одного ряда биохимических превращений, серотонин и мелатонин оказывают схожее действие, предположительно воздействуя на рецепторы необластов. Однако, в связи с тем, что серотонин и мелатонин являются разными веществами, точный характер их влияния на процесс регенерации отличается. Исходя из полученных значений митотического индекса в динамике и их визуализации в виде графиков, можно выдвинуть гипотезу, что серотонин оказывает стабилизирующее действие, в то время как мелатонин повышает интенсивность процессов клеточной жизнедеятельности.

Полученные результаты позволяют дополнить имеющиеся немногочисленные данные о влиянии серотонина и мелатонина на регенерацию планарий. Также они могут являться базой для проведения дальнейших исследований влияния химических веществ на интенсивность клеточного цикла.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шейман М.И., Крещенко Н.Д.* Регенерация планарий. Экспериментальный объект. Онтогенез. 2015. Т. 46. № 1. С. 3-12.
2. *Крещенко Н.Д.* Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий. Биологические мембраны. 2020. Т. 37. № 1. С. 34-44.
3. *Крещенко Н.Д., Митьковский Д.Е.* Серотониновые структуры в нервной системе планарий Polycelis tenuis: морфометрическое исследование. Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2022.
4. *Крещенко Н.Д., Гребенщикова Е.В., Карпов А.Н., Митьковский Д.Е.* Серотонин стимулировал регенерацию глотки в хвостовых фрагментах планарий Schmidtea mediterranea. Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2020.
5. *Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В.* Эффект мелатонина на регенерацию планарий Girardia tigrina. Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 466-469.

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ 5-АМИНО-N-(ТРЕТ-БУТИЛ)-4-{4-[3-(2-ГИДРОКСИ-3-МОРФОЛИНОПРОПОКСИ)ПРО-1-ИН-1-ИЛ]ФЕНИЛ}-2-(МЕТИЛТИО)ТИЕНО[2,3-*d*]-ПИРИМИДИН-6-КАРБОКСАМИДА, КАК НОВОГО ПОЗИТИВНОГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА

Печальнова А.С.[1], Назаров И.Р.[1], Деркач К.В.[1], Диденко Е.А.[1,2], Сорокоумов В.Н.[1,2], Шпаков А.О.[1]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[2]Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. При заболеваниях щитовидной железы, сопровождающихся дефицитом тиреоидных гормонов (ТГ), таких как болезнь Хашимото (аутоиммунный тиреоидит) и различные формы первичного и вторичного гипотиреоза, как правило, назначают заместительную терапию препаратами ТГ. Такая терапия позволяет предотвратить тяжелые последствия гипотиреоза, среди которых нарушения функций нервной системы и опорно-двигательного аппарата, а при дефиците ТГ в детском возрасте – развитие когнитивных дисфункций и отставание в физическом развитии. Однако заместительная терапия имеет множество побочных эффектов, включая нарушение сердечного ритма и остеопороз, которые могут стать препятствием для применения такой терапии, особенно у лиц пожилого возраста [1]. Поскольку многие из этих эффектов реализуются через ядерные тиреоидные рецепторы α-типа, то в последние годы ведется разработка селективных агонистов тиреоидных рецепторов β-типа, но и такие агонисты не лишены серьезных недостатков [2]. Альтернативой им являются агонисты сопряженного с G-белками рецептора тиреотропина, локализованного на поверхности тироцитов. Его активация тиреотропным гормоном (ТТГ), секретируемым тиреотрофами аденогипофиза в ответ на стимуляцию тиролиберином, приводит к запуску в тироцитах каскада реакций, ответственных за синтез и конверсию ТГ. Однако ТТГ и его аналоги, взаимодействующие с внеклеточным ортостерическим сайтом рецептора тиреотропина, имеют крайне ограниченное применение в медицине и не используются для коррекции гипотиреоидных состояний. Более перспективными являются синтетические регуляторы аллостерического сайта рецептора тиреотропина, расположенного в его трансмембранном домене, которые разрабатываются как нами, так и другими авторами [3, 4]. Для

компенсации гипотиреоза, вызванного ослаблением ТГ-продуцирующей функции щитовидной железы, могут быть использованы аллостерические регуляторы с активностью частичных агонистов рецептора тиреотропина [5, 6] или с активностью его позитивных аллостерических модуляторов (ПАМ), способных усиливать эффекты эндогенного гормона – ТТГ. ПАМ рецептора тиреотропина представляют наибольший интерес, поскольку позволяют умеренно повышать уровни ТГ, не индуцируя транзиторный гипертиреоз и даун-регуляцию рецептора тиреотропина, однако имеется только одна работа по их созданию, причем активность таких ПАМ в ней изучена только в отношении дифференцировки тироцитов, а не их гормон-продуцирующей активности [7]. Цель нашей работы состояла в синтезе нового тиенопиримидинового производного с активностью ПАМ рецептора тиреотропина и в оценке его влияния на базальные и стимулированные тиролиберином уровни ТГ в крови и на экспрессию генов синтеза ТГ в щитовидной железе крыс.

Методика. Синтез нового тиенопиримидинового производного, 5-амино-N-(трет-бутил)-4-{4-[3-(2-гидрокси-3-морфолинопропокси)про-1-ин-1-ил]фенил}-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамида (ТПморф), проводили с помощью реакции 5-амино-4-(4-бромфенил)-N-(трет-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамида с 1 морфолино-3-(про-2-ин-1-илокси)пропан-2-олом в тетрагидрофуране в присутствии медь-содержащего катализатора. Очистку ТПморф осуществляли с использованием колоночной хроматографии на силикагеле (первая система – этилацетат/гексан 1/2, вторая система этилацетат/метанол 12/1), выход продукта реакции – 63%. Структуру ТПморф подтверждали данными ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения (найдено *m/z* 570.2196 $[M+H]^+$; вычислено для $C_{28}H_{36}N_5O_4S_2^+$ 570.2203).

Для биологических экспериментов использовали самцов крыс (возраст 3–4 месяца). Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и European Communities Council Directive 1986. При анализе уровней ТГ кровь отбирали из хвостовой вены под местным наркозом, для чего крысам вводили лидокаин в дозе 2-4 мг/кг. В конце эксперимента крыс декапитировали, наркотизируя их хлоралгидратом (400 мг/кг) и забирали ткани щитовидной железы для оценки генной экспрессии. Для определения концентрации свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина использовали наборы фирмы «Иммунотех» (Россия). Для оценки стимулирующего ответа тироцитов на ТТГ использовали тиролибериновый тест, для чего крысам интраназально вводили тиролиберин («Sigma», США), рилизинг-фактор ТТГ, в дозе 100

мкг/крысу, как описано ранее [8]. ТПморф вводили в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно), растворяя его в 200 мкл ДМСО. Контрольной группе вводили только ДМСО (200 мкл).

Формировали 4 группы, в каждой по 6 крыс – контроль (группа К); крысы с интраназальным введением тиролиберина (группа ТРГ); крысы с введением ТПморф (группа ТПморф), крысы с введением ТПморф и через 30 мин тиролиберина (группа ТПморф+ТРГ). Уровни ТГ оценивали через 2 и 3.5 ч после введения ТПморф. После декапитации крыс забирали ткани щитовидной железы, выделяли из них общую РНК и получали кДНК с помощью реакции обратной транскрипции, используя наборы «ExtractRNA» и «MMLV RT Kit» («Евроген», Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора «Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System» («Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.», США), как описано ранее [6]. Структура праймеров, используемых для оценки экспрессии генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*), Na/I-симпортера (*Nis*) и дейодиназы 2 типа (*Dio2*), а также референсных генов, β-актина и 18S-рРНК, были описаны ранее [6].

Статистическую обработку данных проводили с помощью «Microsoft Office Excel 2007», нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка, равенство дисперсий – критерием Левена. Для данных с ненормальным распределением сравнения между группами проводили с помощью H-теста Краскела–Уоллиса. Попарные сравнения проводили с помощью U-теста Манна–Уитни. Для апостериорного анализа использовали тест Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25%; 75%). При условии нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Post hoc анализ проводили с помощью теста Тьюки. Данные представлены как $M \pm SEM$. Все различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Обработка тиролиберином значимо повышала уровни всех форм ТГ в крови крыс, что обусловлено активирующим влиянием этого рилизинг-гормона на секрецию ТТГ тиреотрофами аденогипофиза и, как следствие, стимулирующим влиянием секретируемого ТТГ на продукцию ТГ тироцитами (табл. 1). Обработка животных с помощью ТПморф существенно не влияла на базальные уровни ТГ, но при этом обеспечивала сохранение стимулирующих эффектов тиролиберина на продукцию всех изученных форм ТГ. Более того, ТПморф усиливал стимулирующие эффекты тиролиберина на уровень fT3 через 2 и 3.5 ч и на уровень tT3 через 3.5 ч, что указывает на присущий ему потенцирующий эффект в отношении ТТГ-индуцированной продукции ТГ тироцитами (табл. 1). Поскольку

основными критериями для фармакологической группы ПАМ рецептора тиреотропина являются отсутствие отчетливо выраженного регуляторного влияния на базальные уровни ТГ и потенцирование стимулирующих продукцию ТГ эффектов ТТГ или усиливающего его секрецию тиролиберина [4,9], то соединение ТПморф может быть с полным основанием отнесено к этой фармакологической группе.

Табл. 1. Базальные и стимулированные тиролиберином уровни ТГ в крови крыс при их обработке ТПморф (в/б, 20 мг/кг)

Группа	fT4, пМ	tT4, нМ	fT3, пМ	tT3, нМ
Через 2 ч после обработки Тпморф				
К	36.9±3.0	66.8±3.6	5.07±0.38	3.24±0.19
ТРГ	54.7±3.1 [a]	83.5±4.1	8.72±0.62 [a]	4.03±0.18 [a]
Тпморф	43.2±3.1	72.2±3.1	5.24±0.43	3.63±0.19
Тпморф+ТРГ	59.1±4.1 [a]	96.2±6.6 [a]	11.05±0.68 [a,b]	4.36±0.26 [a]
Через 3.5 ч после обработки ТПморф				
К	37.1±3.6	68.2±4.5	4.92±0.36	3.11±0.20
ТРГ	56.2±1.9 [a]	94.1±3.8 [a]	9.01±0.63 [a]	3.91±0.13 [a]
ТПморф	45.9±2.5	77.4±2.5	5.64±0.33	3.89±0.25 [a]
ТПморф+ТРГ	63.6±4.7 [a]	109.2±7.0 [a]	14.41±1.32 [a,b]	5.54±0.36 [a,b]

Примечание. Различия с группами К ([a]) и ТРГ ([b]) статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$.

Табл. 2. Экспрессия генов тиреоглобулина, тиреопероксидазы, Na/I-симпортера и D2-дейодиназы в щитовидной железе крыс при их обработке ТПморф (в/б, 20 мг/кг)

Группа	*Tg*	*Tpo*	*Nis*	*Dio2*
Контроль	0.95 (0.75; 1.46)	1.04 (0.75; 1.30)	1.05±0.18	1.08±0.15
ТРГ	2.66 (1.84; 3.23) [a]	1.67 (1.40; 2.28) [a]	1.64±0.23	2.74±0.53
ТПморф	1.62 (1.20; 2.78)	1.28 (1.05; 1.40)	1.03±0.23	2.79±0.30 [a]
ТПморф+ТРГ	3.55 (2.37; 5.51) [a]	2.12 (1.59; 3.87) [a]	2.53±0.40[a]	6.74±1.04[a,b]

Примечание. Экспрессию генов оценивали через 3.5 ч после обработки ТПморф. Данные по экспрессии генов *Tg* и *Tpo* имели ненормальное распределение и представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (25%; 75%). Данные по экспрессии генов *Nis* и *Dio2* распределены нормально и представлены в виде $M \pm SEM$. Во всех группах $n = 6$. Различия с контролем ([a]) и группой ТРГ ([b]) статистически значимы при $p < 0.05$.

Исследование экспрессии генов щитовидной железы, вовлеченных в синтез ТГ, в значительной степени подтвердило это заключение. Нами установлено, что экспрессия генов *Tg*, *Tpo* и *Nis*, кодирующих тиреоглобулин, тиреопероксидазу и Na/I-симпортер, основные компоненты синтеза ТГ в щитовидной железе, при обработке ТПморф существенно не отличалась от таковой в щитовидной железе контрольных животных (табл. 2). В группе ТПморф значимо повышалась экспрессия только гена D2-дейодиназы, осуществляющей конверсию тироксина в активную форму трийодтиронина. Обработка тиролиберином повышала экспрессию генов *Tg* и *Tpo*, отмечалась тенденция к повышению экспрессии гена *Dio2* (табл. 2). В присутствии ТПморф эти стимулирующие эффекты сохранялись. Более того, в группе ТПморф+ТРГ отмечали значимое повышение экспрессии генов *Nis* и *Dio2*, а в случае гена *Dio2* экспрессия была повышена не только в сравнении с контролем, но и в сравнении с группой ТРГ. Тем самым, эффект ТПморф, как ПАМ, реализуется непосредственно в тироцитах на уровне зависимой от рецептора тиреотропина регуляции синтеза ТГ.

Таким образом, нами разработано и охарактеризовано по фармакологическому профилю новое тиенопиримидиновое производное ТПморф с активностью ПАМ рецептора тиреотропина, которое при внутрибрюшинном введении крысам усиливало стимулирующие эффекты тиролиберина на уровни ТГ в крови и на экспрессию ключевых тироидальных генов, ответственных за продукцию этих гормонов. В то же время ТПморф слабо или вовсе не влиял на активность системы синтеза ТГ в щитовидной железе в отсутствие тиролибериновой стимуляции. Потенцирующий эффект ТПморф на уровни ТГ в наибольшей степени выявлялся через 3.5 ч после его введения животным, что свидетельствует в пользу стабильности этого соединения и указывает на возможные перспективы его применения в клинике для коррекции гипотиреоидных состояний.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gluvic Z, Obradovic M, Stewart AJ, et al. Levothyroxine Treatment and the Risk of Cardiac Arrhythmias - Focus on the Patient Submitted to Thyroid Surgery. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:758043.
2. Biondi B. Subclinical Hypothyroidism in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome: A Narrative Review. *Nutrients*. 2023;16:87.
3. Davies TF, Latif R. Targeting the thyroid-stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19:835-847.

4. Shpakov AO. Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24:6187.
5. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Fokina EA, et al. Development of low-molecular-weight allosteric agonist of thyroid-stimulating hormone receptor with thyroidogenic activity. *Dokl Biochem Biophys*. 2022;503:67-70.
6. Derkach KV, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, et al. Effect of a Low-Molecular-Weight Allosteric Agonist of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor on Basal and Thyroliberin-Stimulated Activity of Thyroid System in Diabetic Rats. *Int J Mol Sci*. 2025;26:703.
7. Neumann S, Eliseeva E, Boutin A, et al. Discovery of a Positive Allosteric Modulator of the Thyrotropin Receptor: Potentiation of Thyrotropin-Mediated Preosteoblast Differentiation In Vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018;364:38-45.
8. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO. The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res*. 2015;47:916-924.
9. Grundmann M, Bender E, Schamberger J, Eitner F. Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors and Their Allosteric Modulators. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22:1763.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ КСЕНОГЕННЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ И ЭЛАСТИНОВЫХ МАТРИЦ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАРЬЕРНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

Пятина К.В., Минайчев В.В., Звягина А.И., Фадеева И.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Введение. Использование натуральных резорбируемых барьерных мембран (БМ) для направленной регенерации тканей (НРТ) в челюстно-лицевой хирургии является стандартной и часто единственной методикой при восстановлении дефектов костной ткани и тканей десневого лоскута, включая закрытый/открытый синус-лифтинг и расщепление альвеолярного гребня. Однако, несмотря на широкое применение, современные БМ обладают рядом ограничений: (1) неконтролируемая преждевременная резорбция, снижающая надёжность; (2) недостаточная механическая прочность, осложняющая работу хирурга; (3) отсутствие дополнительных биоактивных компонентов, ограничивающее одновременную регенерацию кости и мягких тканей. Эти факторы снижают эффективность и предсказуемость НРТ, делая невозможным полноценное восстановление сочетанных дефектов. На основании анализа литературных данных и собственного задела [1-3] коллективом авторов разработаны различные подходы к созданию высокоэффективных материалов для НРТ, включающие выделение коллагенового внеклеточного матрикса (ВКМ) для создания БМ для регенерации костной ткани и выделение эластинового ВКМ-компонента для создания БМ для регенерации тканей десны. Данные материалы могут использоваться как по отдельности, так и в составе композитной БМ, действие которой может быть направлено на сочетанную регенерацию костной ткани и тканей десны. Целью данной работы является изучение цитотоксического действия коллагеновых и эластиновых матриц, полученных с использованием различных методов экстракции компонентов ВКМ из разных биологических источников.

Материалы и методы.

Получение и обработка материалов. Для получения коллагеновых матриц использовали фрагменты ксеногенного перикарда (бык) в зоне основной ткани (ОЧ), характеризующейся повышенным содержанием коллагеновых волокон. Децеллюляризацию проводили двумя методами: (1) обработкой 0,5% раствором дезоксихолата натрия (ДХН) с последующей отмывкой для удаления остаточного детергента из тканей;

(2) комбинированным воздействием гипотонического шока (ГШ) и нуклеаз (0,02% РНКазы, 0,2% ДНКазы). Эластиновые матрицы получали из двух анатомических зон: бифуркации аорты (А) и участков перикарда в области прикрепления связок (СА) (выбор обусловлен высоким содержанием эластических волокон в данных структурах). Для децеллюляризации и селективного удаления коллагена применяли следующие протоколы обработки: (1) температурная (авт) – автоклавирование в дистиллированной воде (110 кПа, 7 ч), (2) щелочная (NaOH) – кипячение в 0,1 н NaOH (1 ч), (3) комбинированная обработка ДХН в сочетании с температурной обр., (4) комбинированная обработка ДХН в сочетании с щелочной обр. Часть фрагментов аорт подвергали (5) обработке 5% раствором CNBr, в двух вариантах: (5.1) без дополнительной отмывки и (5.2) с последующей отмывкой в физрастворе для удаления остаточного CNBr, а также (6) комбинированной обработке ДХН в сочетании с последующей обработкой CNBr по описанному выше способу (6.1) с отмывкой и (6.2) без неё.

Культура клеток. Зависимые от прикрепления фибробластоподобные мышиные клетки линии L-929 были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт- Петербург). Клетки культивировали в питательной среде EMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 40 мг/л гентамицина, в CO_2-инкубаторе (37°C, 5% CO_2).

Исследование цитотоксичности. Исследование цитотоксичности полученных матриц проводили в модели прямого контакта в соответствии с ГОСТ ISO 10903-5. Клетки высаживали на поверхность 96-луночного планшета в концентрации $5*10^3$ клеток/см^2, культивировали до субконфлюэнтного состояния, после чего заменяли среду на свежую. Затем в стерильных условиях в лунки планшета вносили исследуемые матрицы (3×3 мм) и инкубировали с клетками в течение 72 часов. Количество живых клеток после их инкубации с матрицами оценивали с помощью флуоресцентного красителя резазурина – редокс-индикатора на $NADH/H^+$ (AlamarBlue, Invitrogen, США) в сравнении с контролем (культуры без добавления матриц) с помощью планшетного ридера Infinity F200 (Tecan, Австрия).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных и визуализации полученных результатов использовали языки программирования Python 3 (версия 3.10.0) в среде разработки Spyder. Во всех экспериментах использовались статистические выборки с не менее чем 4 наблюдениями ($n \geq 4$). Различия между группами считали статистические значимыми при $p<0,05$. Данные на графиках представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Для сравнения двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Перед

проведением множественных сравнений между группами данные предварительно тестировали на нормальность распределения и равенство дисперсий с использованием критериев Шапиро-Уилка и Брауна-Форсайта, соответственно. Для данных с ненормальным распределением использовали H-критерий Краскела-Уоллеса с последующим сравнением групп между собой с использованием теста Данна. Для данных с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением групп между собой с использованием теса Холма-Сидака.

Результаты. Исследование цитотоксичности коллагеновых матриц после 72ч инкубации с клетками L-929 показало отсутствие статистически значимого отличия исследованных групп по сравнению с клетками, культивировавшимися в контрольных условиях (рис. 1Б). Число живых клеток, культивировавшихся с матрицами, полученных с использованием гипотонического шока, составило 87±8%, а для полученных с использованием ДХН 91±2% относительно контроля (рис. 1А).

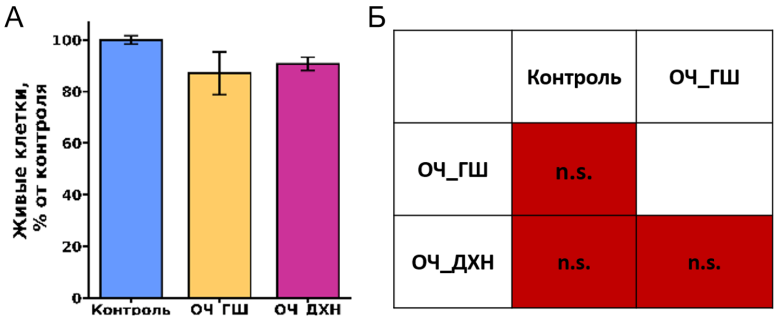


Рис. 1. А – Цитотоксичность коллагеновых матриц (ОЧ) после 72 ч культивирования с клетками L-929. Б – результаты множественного сравнения групп с использованием H-критерия Краскела-Уоллеса с апостериорным тестом Данна. Среднее (n≥4) ± стандартное отклонение. **n.s.** – отсутствие статистически значимого отличия.

Поскольку эластин как структурный белок за счет наличия большого количества межмолекулярных сшивок чрезвычайно устойчив к действию большинства протеаз и химических агентов [4,5] для его выделения из использовались жесткие условия, включающие либо температурную обработку (авт), либо щелочную (NaOH). Исследование цитотоксичности эластиновых матриц, полученных разными способами, показало отсутствие цитотоксического эффекта как при использовании одиночного воздействия, так и при комбинированных обработках (ДХН+авт и ДХН+NaOH) (рис. 2).

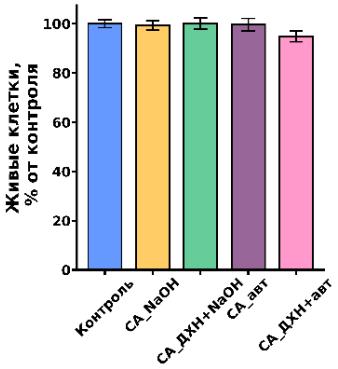


Рис. 2. Цитотоксичность эластиновых матриц (CA) через 72ч культивирования с клетками L-929.

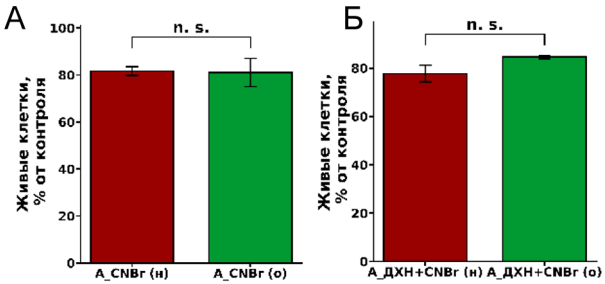


Рис. 3. Цитотоксичность отмытых и неотмытых эластиновых матриц (аорта), полученных с использованием CNBr (А) и ДХН+CNBr (Б) после 72 культивирования с клетками L-929. Среднее (n≥4) ± стандартное отклонение. n.s. – отсутствие статистически значимого отличия (U-критерий Манна-Уитни).

Цианогенбромид (CNBr) обеспечивает избирательное расщепление метиониновых связей в белках, что позволяет эффективно удалять неэластиновые компоненты (коллаген) при сохранении целостности межмолекулярных сшивок эластина. Также CNBr эффективен при низких температурах и применим для плотных тканей (аорта) [3]. При этом известно, что CNBr является токсичным агентом и его сохранение в ВКМ может повышать его цитотоксическое действие. Вследствие этого была исследована цитотоксичность эластиновых матриц, полученных из аорт, неотмытых от CNBr и подвергшихся дополнительной отмывке (рис. 3).

Результаты показали, что в обоих случаях количество живых клеток снижалось до 80%, независимо от отмывки, что может быть связано с большей толщиной аорты (по сравнению с перикардом), препятствующей полному выведению CNBr из ВКМ. Для проведения дальнейших исследований использовали отмытые образцы.

В ходе исследования цитотоксичности эластиновых матриц было установлено, что ни один из примененных методов обработки не вызывал значительной гибели клеток. Во всех опытных группах число живых клеток превышало 70%. При этом наименьший цитотоксический эффект проявляли материалы, полученные температурной обработкой (рис. 2,4). Матрицы, полученные щелочной обработкой, снижали число живых клеток до значения 86±1% относительно контроля (рис. 4А). Схожий эффект наблюдался для обработок CNBr (рис. 3А) и ДХН+CNBr (рис. 3Б), где число живых клеток составило 81±6% и 84,5±0,6% от контроля, соответственно.

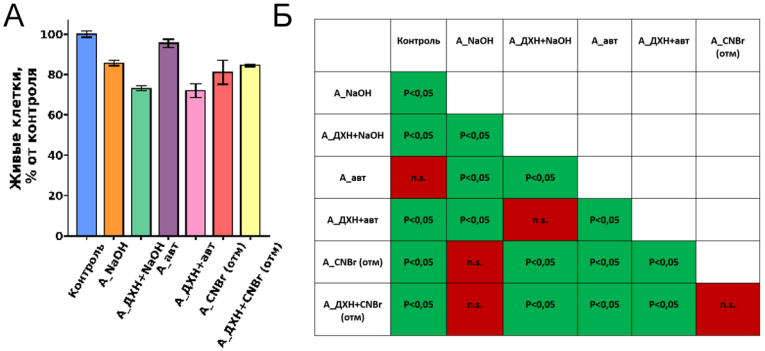


Рис. 4. А – Цитотоксичность эластиновых матриц (аорта) после 72ч культивирования с клетками L-929. Б – результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным тестом Холма-Сидака. Среднее (n≥4) ± стандартное отклонение. n.s. – отсутствие статистически значимого отличия.

При этом комбинированные обработки фрагментов аорты, включающие обработку ДХН с последующей температурной, либо щелочной обработкой, проявляли более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с другими материалами. Так число живых клеток для ДХН+NaOH составило 73±1%, а для ДХН+авт 72±3% от контроля (рис. 4). Подобный эффект может быть обусловлен воздействием агрессивных обработок на мицеллы ДХН, сохраняющиеся в толще ВКМ. В частности, автоклавирование способно разрушать мицеллярные структуры, что

приводит к образованию свободных молекул ДХН в ВКМ, обладающих цитотоксической активностью. Кроме того, поскольку ДХН является анионным детергентом, дополнительная обработка щелочью при высоком значении pH (pH 14) также может снижать стабильность мицелл, что способствует их распаду, высвобождению токсичных компонентов ВКМ и клеток, а также образованию свободных молекул ДХН, которые сохраняются в толще ВКМ.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Коллагеновые матрицы, полученные обработками ДХН и гипотоническим шоком, не проявляют цитотоксическое действие *in vitro*.

2. Полученные эластиновые матрицы не оказывают выраженного цитотоксического действия *in vitro*. Однако комбинированные методы приводят к снижению жизнеспособности клеток, вероятно, из-за дестабилизации мицелл ДХН.

3. Эластиновые матрицы, полученные с использованием цианогенбромида, сохраняют цитотоксичность *in vitro* после дополнительной отмывки, что указывает на необходимость модификации протокола выделения матрицы.

4. Для эластиновых матриц оптимальным источником является перикард области прикрепления связок, поскольку он обеспечивает более эффективное удаление токсичных реагентов из ВКМ на этапе его очистки по сравнению с аортой.

Заключение. Исследованные способы получения коллагеновых и эластиновых матриц обеспечивают приемлемую биосовместимость (>70% жизнеспособности). Однако комбинированные методы с использованием ДХН требуют оптимизации для снижения цитотоксичности, а использование CNBr – дополнительной очистки ВКМ от токсичных агентов. Наименее цитотоксичными являются перикардиальные матрицы, полученные обработками ДХН, гипотоническим шоком и температурной обработкой.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-73-10208 (https://rscf.ru/project/24-73-10208/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Фадеева И.С. и др. Исследование биоинтеграции и прочностных свойств нового биоматериала, изготовленного из ксеногенного перикарда для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019;4; 483-487.
2. Zvyagina A, et al. Elastin Barrier Membranes for Guided Tissue Regeneration Technologies. BIO Web of Conferences. 2023;57.

3. Akatov VS, Fadeeva IS, et al. The role of recipient cells in the mechanism of pathological calcification of heart valve transplants. Biophysics. 2010;55(5):822-825.
4. Daamen WF, et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. Biomaterials. 2007;28(30):4378-4398.
5. Heinz A. Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2020;55(3):252-273.
6. Daamen WF, et al. Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. Biomaterials. 2001;22(14):1997-2005.

АНАЛИЗ ПРИНЦИПОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН СИНАПСОВ

Ратушняк А.С., Шевырина В.А., Сорокоумов Е.Д., Проскура А.Л.

Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Новосибирск, Россия

Введение. По современным междисциплинарным представлениям, ключевую роль в работе нейронных сетей мозга играют межклеточные контакты – синапсы. Межнейронные связи формируются, модифицируются и усложняются в зависимости от предшествующей синаптической активности зафиксированной в молекулярных ансамблях. Нейрон принимает множество сигналов являясь членом многих сетей. Становится очевидным, что ассоциативные связи возникают в пределах нейрона, а, возможно, и в молекулярных сетях синапса благодаря реактивности (молекулярным реакциям), инициированной множеством не только медиаторных внешних сигналов. Для понимания базовой функции синаптических контактов, как происходит трансляция активации медиаторных и не медиаторных рецепторов нейрона в изменении его контактов с другими нейронами, необходимо создание их имитационных моделей как теоретических, так и экспериментальных. Однако создание таких моделей наталкивается на проблемы, которые в силу своего разнообразия перерастают из методических в принципиальные.

Моделирование молекулярных сетей с целью выявления их функциональной роли сталкивается, как правило, с их неупрощаемой сложностью. Даже внутренняя молекулярная машина синапса, состоящая из более чем тысячи различных взаимодействующих молекул не может быть смоделирована без существенных упрощений. А такие упрощения ведут к получению недостаточно функционально и прогностически валидных результатов, как правило. Понятно, что анализ даже простейших биоинформационных систем возможен на основе моделирования фундаментальных основ их возникновения и эволюции [1,2]. Проблемы связанные с анализом функции биологических информационных молекулярных систем привели к попыткам создания их концептуальных, феноменологических и имитационных моделей [3, 4 и др.]. Результаты такого моделирования всей молекулярной машины не позволяют прийти к однозначным выводам о базовой функции этой структуры. С использованием существующих технологий, достичь результата за астрономически обозримое время не представляется реальным [например, 4-5]. Строя модели гипотетических биосистем при их возникновении, эволюции и опираясь на такие модели можно попытаться создавать анализировать конструкции, приближенные к реально

существующим. Естественно увеличивая их сложность до пределов аппаратных ограничений. В связи с этим в работе предпринята попытка моделирования предельно простой системы выполняющей базовую функцию биосистем – стабилизацию гомеостаза, комплексной энтропии. Учитывая преемственность, эмерджéнтность организации биологических систем можно надеяться на успешность такого подхода.

Другим не менее значимым подходом к выявлению базовых функций синапса как молекулярной информационной машины является ее экспериментальный анализ. На этом пути также существуют множество не решенных проблем. Главная из них это отсутствие разработанных технологий взаимодействия с наноразмерными структурами. В работе осуществлено экспериментальное моделирование информационного входа на соме нейрона. Модулирование функций такой вновь образуемой структуры осуществлялось биологически активными веществами, выполнявшими роль молекулярных инструментов.

Результаты. С целью изучения принципов и молекулярных механизмов функционирования синапсов и разработки модели информационных процессов предприняты попытки моделирования возможных элементов молекулярных систем синапса и экспериментальный анализ модификации весов отдельных модельных входов клетки.

При создании имитационных моделей молекулярных машин синапса исходили из предположения, что на начальном этапе возникновения и эволюции биосистем самосборкой могли формироваться достаточно простыет молекулярные конструкции. Из таких, по сути цифровых логических устройств, в дальнейшем собирались системы способные рецептировать внешние воздействия обрабатывать и использовать обнаруженные и зафиксированные ассоциативные связи для обеспечения сохранения устойчивости системы в дальнейшем. Можно предположить, что в межклеточных контактах такие молекулярные машины определяющие взаимосвязи внешних медиаторных и других сигналов играют ключевую роль. Для проверки предположения о роли запоминания ассоциативных воздействий в увеличении устойчивости системы разработана модель простейшего биоагента [например, 6] (Рис. 1).

Для экспериментальной проверки некоторых гипотетических предположений проведены экспериментальные исследования возможности нейронов запоминать и использовать ассоциативные, корреляционные связи при внешних воздействиях.

Для экспериментальной проверки некоторых гипотетических предположений проведены экспериментальные исследования возможности нейронов запоминать и использовать ассоциативные, корреляционные связи при внешних воздействиях.

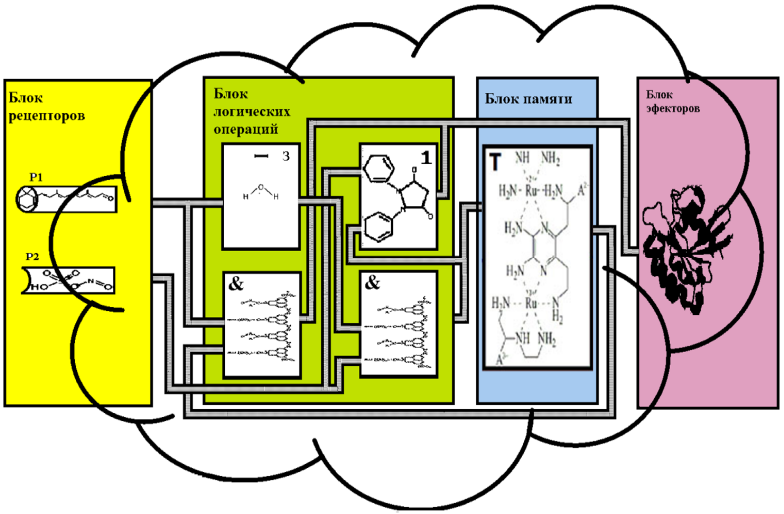


Рис. 1. Вариант эскизной схемы протобиологического агента (коацервата) с элементами молекулярных структур, выполняющих логические операции. Агент состоит из рецепторного блока (R1, R2), блока логических операций и памяти (элементы логики - & («И»), 1 («ИЛИ»), З – задержка, Т – триггер - элемент памяти) и эффекторов – Э.

В биофизических исследованиях молекулярных информационных систем большое значение имеет выбор экспериментальных моделей. В данной работе в качестве модели использовались изолированные нейроны и реконструированные in vitro нейронные сети. Такая модель позволяет создавать на отдельных участках клетки зоны пластичности и инструментально регистрировать изменения, происходящие в процессе выработки нейрональных реакций.

Работа проведена на культивируемых нейронах *Lymnaea Stagnalis* (возраст 0,5-1,5 года) изолированных при помощи ферментативной обработки. На нейроне организовывалось несколько информационных входов и проводились ассоциированные воздействия (Рис. 2). Для формирования пластических реакций использовалась электростимуляция участков мембраны (8-10 мкм) или электрические и химические воздействия на локальную зону мембраны нейрона. При этом вначале формировался стимул, вызывающий только колебания мембранного потенциала, а затем стимул, вызывающий генерацию клеткой потенциала действия.

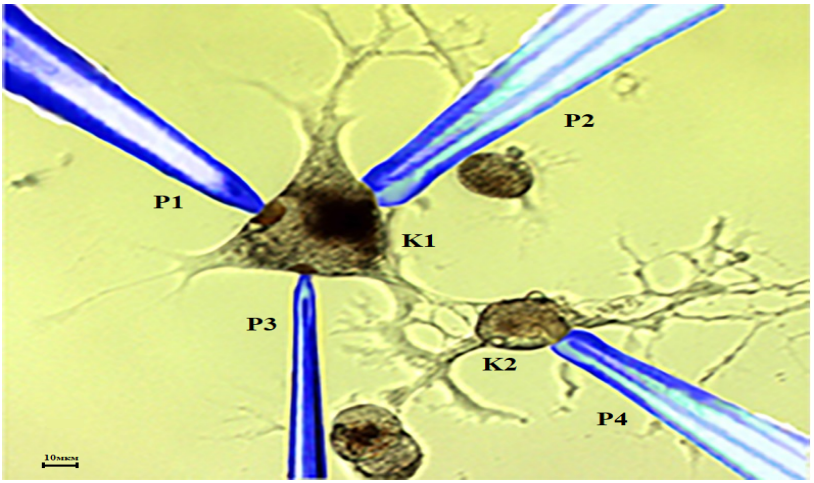


Рис. 2. Моделирование информационных входов на нейронах в простой сети. K1-K5 нейроны *Lymnaea Stagnalis* в культуре ткани. P1-P4 микропипетки моделирующие информационные входы.

Критерием выработки служило появление, после ряда ассоциированных воздействий, ответов на стимул, исходно не вызывавший генерацию потенциалов действия, и сохранение этих ответов несколько минут (Рис. 3).

Для продвижения к пониманию молекулярных механизмов информационных процессов в клетке при ассоциированных воздействиях проводилась модификация отдельных молекулярных ансамблей в этих зонах. Это позволило модулировать время развития и сохранения достигнутого уровня реакции. В выбранной модели локально изменяли состояние цитоскелета, не нарушая его функции по всему объему клетки. Регистрировались ионные токи всей клетки и на нескольких участках мембраны, конфигурация whole-cell и loose patch-clamp и оптические характеристики исследуемых зон нейрона.

Ранее нами было показано, что нарушения динамических перестроек цитоскелета, вызванные экзогенными лигандами актина и тубулина, оказывают влияние на реализацию, сохранение и повторную выработку пластических реакций [7,8]. Эти данные подтвердили предположение, что исходное состояние и структурные перестройки актинового цитоскелета, обусловленные активностью белков, модулирующих эти процессы, могут оказывать влияние на пластические свойства клетки. Можно предположить, что первой реакцией клетки на воздействие может быть

нарушение связей мембранных структур с кортикальным актиновым цитоскелетом. Это, не изменяя активности отдельных молекул, приводит к изменению ответов. Нарушение связи ионных каналов с цитоскелетом проявляется как уменьшение трансмембранных ионных токов нейронов, без изменения активности отдельных каналов, проводящих эти ионы.

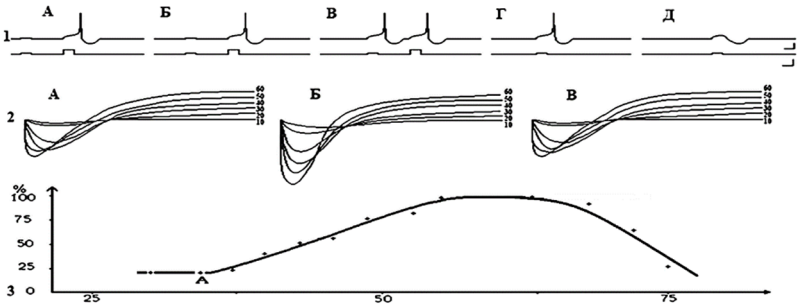


Рис. 3. Выработка реакции нейрона на ассоциированный стимул. 1. Верхний график – мембранный потенциал клетки К1, нижний график стимулы через Р1 и Р2, 1А ответ на первое предъявление ассоциированного подпорогового и надпорогового стимулов: 1Б – после 5 сочетаний стимулов. 1В - после 50 сочетаний стимулов. 1Г – ответ на условный ранее не эффективный стимул. 1Д – через 75 стимулов.
2А – трансмембранные ионные токи в начале стимуляции. 2Б – токи на этапе появления ответов на ранее не эффективный стимул. 2В – токи при стабильном ответе на первый стимул. 3 – Усредненная кривая ответов на исходно не эффективный стимул. Калибровки 10 мВ и 3 мсек.

Ранее нами было показано, что нарушения динамических перестроек цитоскелета, вызванные экзогенными лигандами актина и тубулина, оказывают влияние на реализацию, сохранение и повторную выработку пластических реакций [7,8]. Эти данные подтвердили предположение, что исходное состояние и структурные перестройки актинового цитоскелета, обусловленные активностью белков, модулирующих эти процессы, могут оказывать влияние на пластические свойства клетки. Можно предположить, что первой реакцией клетки на воздействие может быть нарушение связей мембранных структур с кортикальным актиновым цитоскелетом. Это, не изменяя активности отдельных молекул, приводит к изменению ответов. Нарушение связи ионных каналов с цитоскелетом проявляется как уменьшение трансмембранных ионных токов нейронов, без изменения активности отдельных каналов, проводящих эти ионы.

Для проверки таких предположений структуры цитоскелета, модифицировались гелсолином – белком, активируемым ионами кальция и модулирующим разборку актиновых нитей цитоскелета.

Гелсолин вызывал значительное уменьшение входящих ионных токов и подавлял развитие реакции привыкания на электрическую стимуляцию. Таким образом, было показано, что реакция клетки на внешний сигнал может зависеть не только от характера сигнала, но и от состояния кортикального актинового цитоскелета зоны воздействия, т.е. от пространственной локализации молекулярных структур на этом участке нейрона.

Эти данные подтверждают предположение, что белки, модулирующие динамическую подвижность цитоскелета и активируемые вторичными посредниками, могут принимать участие в трансляции информации о экстраклеточной среде в микроизменения молекулярной машины нейрона и таким образом обусловливать специфику пластических реакций.

Заключение. Полученные и литературные данные позволяют предположить, что основной функцией нейрона (кроме восприятия и передачи информационного сигнала) является, как и у клетки в целом, логический анализ комплекса входных сигналов, запоминание ассоциации нескольких (медиаторных и иных сигналов) и формирование реакции с учетом значимости поступающей информации для сохранения гомеостаза. Такие реакции осуществляются молекулярной машиной синапса с непосредственным участием цитоскелета. Высказанные предположения нуждаются в дальнейшей теоретико-экспериментальной проверке, естественно. В работе использованы ранее опубликованные материалы [например 9, 10]

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра информационных и вычислительных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zane R. Thornburg, David M. Bianchi, Troy A. Brier and others, Fundamental behaviors emerge from simulations of a living minimal cell. Cell, Vol. 185, Issue 2, p345-360.e28, Published in issue: January 20, 2022, doi.10.1016/j.cell.2021.12.025
2. Abhishek Singharoy, Christopher Maffeo, Karelia H. Delgado-Magnero and others, Atoms to Phenotypes: Molecular Design Principles of Cellular Energy Metabolism, Cell, Vol. 179, Issue 5, p1098–1111.e23, Published in issue: November 14, 2019, doi. 10.1016/j.cell.2019.10.021
3. Fuster J. M. 2009. Cortex and Memory: Emergence of a New Paradigm. J. Cognitive Neurosci. 21, 2047-2072.

4. Nakajima T. Biologically inspired information theory: Adaptation through construction of external reality models by living systems. Prog Biophys Mol Biol. 2015;119(3):634-648.
5. Marijuán PC, Navarro J, del Moral R. How the living is in the world: An inquiry into the informational choreographies of life. Prog Biophys Mol Biol. 2015;119(3):469-480.
6. Ратушняк А.С., Проскура А.Л., Шевырина В.А. Моделирование формирования протобиологических молекулярных функциональных систем // XXVI Международная научно-техническая конференция «Нейроинформатика-2024» Сборник научных трудов (Москва 21-25.10.2024) М.: Национальный Исследовательский Ядерный Университет МФТИ, 2024. - 258 с. ISBN 987-5-7417-0797-5, УДК 001(06)+004.032.26(06) С 213-220.
7. Запара ТА, Симонова ОГ, Жарких АА, Ратушняк АС., Влияние динамического состояния цитоскелета на пластичность нейронов. Рос. Физиол. Ж Им И М Сеченова. 1999 Янв;85(1):128-38.
8. Ратушняк АС, Запара ТА, Жарких АА, Ратушняк ОА., Влияние изменений динамического равновесия в системах микротрубочек и микрофиламентов на пластические реакции нейронов Ж Высш Нерв Деят. Им И П Павлова. 1996 Мар-Апр;46(2):355-62.

ПРОФИЛИ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ СУБЭПИКАРДА СЕРДЦА СУСЛИКОВ *SPERMOPHILUS PYGMAEUS* В ПЕРИОД ИХ АКТИВНОСТИ И ГИБЕРНАЦИИ

Степанов А.В.[1], Добрецов М.Г.[1], Филиппов Ю.А.[1], Никитина Е.Р.[1], Бекшоков К.С.[2], Кубасов И.В.[1]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[2]Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

Введение. Гибернация, или зимняя спячка, является адаптивной стратегией, используемой для выживания животных в условиях низкой температуры окружающей среды, дефицита пищи и воды [1,2]. Зимняя спячка мелких грызунов является прерывистой и состоит из чередующихся циклов – баутов, которые включают в себя вход в торпидное состояние, пребывание в нем (около 7-14 дней) и кратковременное пробуждение [3]. Сердце гибернирующих видов животных весьма устойчиво к так называемым холодовым аритмиям, что снижает риски ишемически-реперфузионных повреждений [4]. Клеточные основы таких адаптивных механизмов гибернирующих животных нуждаются в изучении. Одним из возможных механизмов защиты от холодовых аритмий рассматривается ремоделирование ионных каналов кардиомиоцитов. Не исключено и ремоделирование t-системы кардиомиоцитов. Ранее нами была разработана методика регистрации внеклеточных потенциалов действия (вПД) от изолированного сердца крысы, позволяющая осуществлять регистрацию вПД от различных компартментов клеточной мембраны субэпикардиальных кардиомиоцитов [участки, включающие выходы t-трубочек (вПД2) и свободные от них (вПД1)] и проводить оценку распределения выходов t-трубочек на поверхностной мембране клетки [5–7]. Было показано, что данный метод позволяет определить уровень структурно-функционального ремоделирования кардиомиоцитов при ряде патологических и адаптационных изменений в сердце [7–9].

Целью данной работы было исследовать изменения профилей вПД и распределение t-трубочек на поверхностной мембране субэпикардиальных кардиомиоцитов изолированного сердца суслика в активный период и в период спячки.

Методы исследования. Исследования проводили на сусликах *Spermophilus pygmaeus* обоих полов, отловленных в республике Дагестан в мае – июне и транспортированных в ИЭФБ РАН. С августа по конец сентября животных содержали в индивидуальных клетках при цикле свет

– темнота 12:12 ч и температуре 23-25°C. Животных кормили рационом для грызунов с добавлением семян подсолнечника, свежих овощей и яблок. Суслики летней группы выступали в качестве контроля (n=6). С начала октября оставшихся животных (n=5) помещали в темную холодную камеру с температурой окружающей среды 3-5°C. Эксперименты со спящими животными проводились с января по февраль, когда продолжительность баута составляла 14-15 дней. Животных брали в эксперимент в середине баута.

Электрофизиологические эксперименты с использованием стеклянных внеклеточных микроэлектродов с диаметром кончика 5 μм проводили на левых желудочках (ЛЖ) изолированных сердец сусликов в условиях сохраненного синусового ритма, при постоянной перфузии аэрируемым раствором Тироде по методу Лангендорфа в соответствии с ранее описанным методом [5]. Животных анестезировали смесью золетила (40 мг/кг массы тела; Virbac, Франция) и ксилазина (10 мг/кг массы тела; Нита-Фарм, Россия), после чего сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой микроэлектродной регистрации. На сердцах всех животных (активных и спящих) эксперименты проводили при температуре раствора 36-37°C. Скорость перфузии составляла 5-7 мл/мин. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) производили с использованием программируемой вытяжки микроэлектродов (Sutter Instr., Model P-1000, США) из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм; микроэлектрод заполняли раствором Тироде. Сопротивление заполненного раствором кончика микроэлектрода составляло около 2 МОм. Устранение сократительных ответов сердца обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФ-азы 2,3-бутандион моноксима (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 мМ.

Все полученные данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро–Уилка) и, в соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в контрольной и экспериментальной группах оценивали как достоверные при $p<0.05$ с применением соответствующего параметрического теста. Представленные в тексте данные приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

Предварительную оценку распределения t-трубочек кардиомиоцитов изолированного сердца проводили с использованием конфокального микроскопа и флуоресцентного красителя DI-8-ANEPPS (10 мкМ; Santa Cruz Biotechnology, США) согласно ранее описанной методике [6,8]. В каждом эксперименте флуоресцентный сигнал регистрировался в нескольких (5–10) произвольно выбранных полях наблюдения в пределах первого слоя кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ

сердца. Первичный анализ всех накопленных в этих исследованиях данных производился с помощью программного обеспечения Fiji – ImageJ. Для каждого исследованного кардиомиоцита анализировалось распределение интервалов между соседними t-трубочками в пределах узкого (1 μм шириной) района интереса, параллельного длинной оси клетки, и рассчитывались средняя длина интервалов между t-трубочками и доля интервалов, длина которых превышает 3 μм (т.е. доля интервалов с участками, лишёнными t-трубочками).

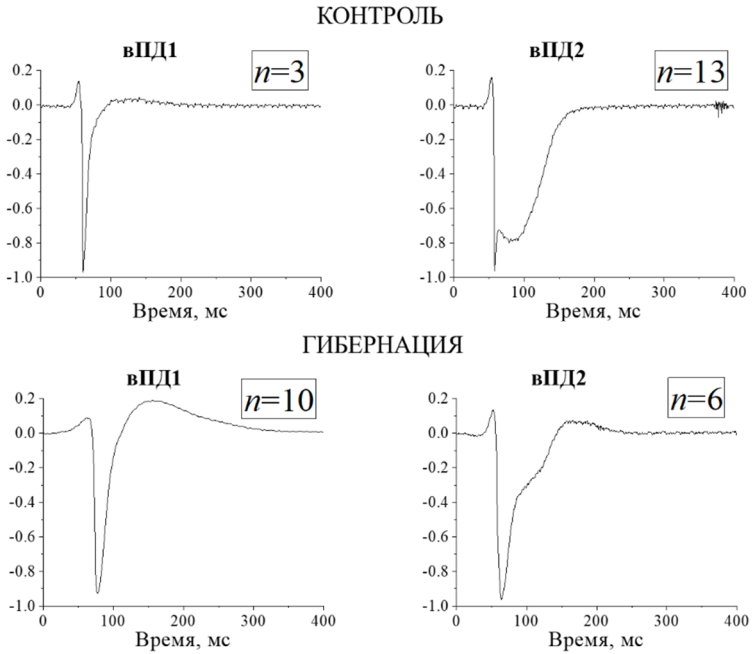


Рис. 1. Усредненные профили регистрируемых вПД 1-го и 2-го типов субэпикарда кардиомиоцитов ЛЖ индивидуальных изолированных сердец сусликов в период активности (контроль; **сверху**) и гибернации (**снизу**). Каждый показанный трек вПД – результат усреднения нескольких (число над треками) регистраций ответов соответствующего типа от данного сердца.

Результаты. *Электрофизиологические исследования.* На рис. 1 представлены примеры разных типов вПД сердец контрольных и

гибернирующих сусликов, формирующих два типа ответов: вПД1 и вПД2 – сигналы с одним или двумя выраженными пиками (или одним негативным пиком с выраженным изломом на его спаде) соответственно. В период гибернации, как показано на рис. 2, в субэпикардиальных

кардиомиоцитах сердец исследуемых животных наблюдается достоверные изменения формы вПД, проявляющиеся в снижении амплитуды второго пика вПД2-ответов, нормализованного к величине первого пика, увеличении длительности спада до 90% (T_{90}) у вПД1 и его укорочении у вПД2. Кроме того, у гибернирующих сусликов профили обоих типов вПД сопровождаются значительно увеличенной фазой следовой гиперполяризации (СГ), в которой по завершении вПД потенциал снижается ниже уровня базовой линии. Существенные изменения в период гибернации наблюдаются также и в соотношении частоты регистрации в ЛЖ ответов первого и второго типов в сторону повышения числа регистрируемых вПД1. Средняя частота регистрации (встречаемости) вПД1 и вПД2 в ЛЖ контрольных животных составляла 17,5±2,3% и 85,2±2,2%, тогда как при гибернации соответствующие значения оставляли 47,4±3,3% и 50,4±2,4%.

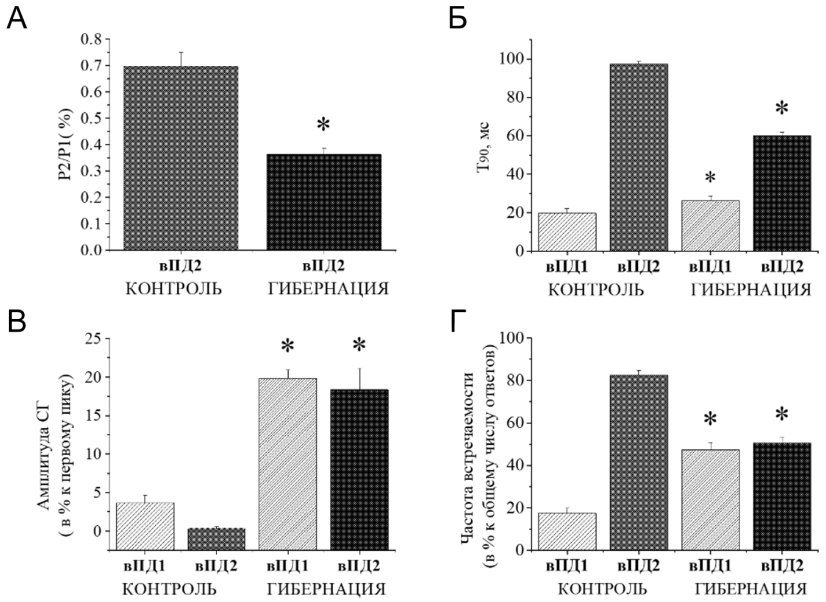


Рис. 2. Средние значения амплитуды второго пика нормализованных ответов P2/P1 (А), T_{90} (Б), амплитуды следовой гиперполяризации нормализованных вПД (В) и частоты встречаемости вПД1 и вПД2 (Г).

* – достоверные отличия средних значений параметров вПД гибернирующих сусликов от аналогичных параметров в контроле ($p<0.05$; t-критерий Стьюдента; представлены средние значения для 6 сердец контрольных и 5 сердец гибернирующих сусликов).

Анализ распределения t-трубочек кардиомиоцитов изолированного сердца с использованием конфокальной микроскопии. В предварительных экспериментах, направленных на изучение целостности структуры тубулярного аппарата кардиомиоцитов, были изучены сердца одного контрольного и двух гибернирующих сусликов. Результаты этого анализа не показали очевидных отличий между экспериментальными группами ни по величине среднего интервала, ни в частоте встречаемости длинных интервалов между соседними t-трубочками. При этом исследуемые параметры как активных, так и гибернирующих сусликов были сходны с аналогичными параметрами, полученными нами ранее для кардиомиоцитов ЛЖ сердца крыс [6].

Обсуждение результатов. В ходе выполненных исследований было установлено, что в условиях гибернации профили вПД обоих типов у субэпикардиальных кардиомиоцитов сусликов претерпевают существенные изменения. Увеличение T_{90} у вПД1 может свидетельствовать о подавлении части потенциал-зависимых K^+-каналов. Наряду с этим, существует также и активация (возможно, компенсаторная) K^+-каналов реполяризационного резерва, обеспечивающих снижение амплитуды второго пика и укорочение длительности вПД2 и увеличение фазы СГ в ответах обоих типов. В частности, такими каналами могут быть K^+-каналы низкой проводимости (SK-каналы), чья активность ответственна за формирование фазы СГ вПД у крыс при различных кардиомиопатиях [7–9]. На этом фоне существенное увеличение T_{90} вПД1 и снижение амплитуды второго пика у вПД2 предположительно могут свидетельствовать и о перераспределении потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов L-типа между поверхностной мембраной и мембраной тубулярного компартмента кардиомиоцитов в условиях гибернации. Однако эти предположения нуждаются в дополнительной проверке.

Отсутствие выраженных различий между экспериментальными группами по величине среднего интервала между соседними t-трубочками предполагает отсутствие изменений в структурной организации Т-системы кардиомиоцитов у гибернирующих сусликов. Этому, однако, противоречит наше наблюдение увеличения доли вПД1 относительно вПД2 в кардиомиоцитах. Возможно, последнее наблюдение может быть объяснено тем, что гибернирующие суслики имеют существенно более низкую плотность функциональных t-трубочек (за счет снижения плотности, в первую очередь, Na^+- и Ca^{2+}-каналов в мембране Т-системы). Это предположение требует дальнейших исследований Конфокальные исследования также требуют анализа большего количества сердец, чем было исследовано в данной работе.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruf T, Geiser F. Daily torpor and hibernation in birds and mammals. Biol Rev Camb Philos Soc. 2015;90(3):891-926. doi:10.1111/brv.12137
2. Staples JF. Metabolic Flexibility: Hibernation, Torpor, and Estivation. Compr Physiol. 2016;6(2):737-771. doi:10.1002/cphy.c140064
3. Heldmaier G, Ortmann S, Elvert R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. Respir Physiol Neurobiol. 2004;141(3):317-329. doi:10.1016/j.resp.2004.03.014
4. Johansson BW. The hibernator heart--nature's model of resistance to ventricular fibrillation. Cardiovasc Res. 1996;31(5):826-832. doi:10.1016/0008-6363(95)00192-1
5. Kubasov IV, Stepanov A, Bobkov D, et al. Sub-cellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat Hearts. Front Physiol. 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.00061
6. Kubasov IV, Bobkov DE, Stepanov AV, Sukhov IB, Chistyakova OV, Dobretsov MG. EVALUATION OF THE T-SYSTEM OF RAT CARDIOMYOCYTES DURING EARLY STAGES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES. Russ J Physiol. 2020;106(9):1098-1108. doi:10.31857/S0869813920090046
7. Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG. Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes. J Evol Biochem Physiol. 2021;57(6):1511-1521. doi:10.1134/S0022093021060272
8. Stepanov AV, Dobretsov MG, Novikova EV, Filippov YuA, Kubasov IV. Remodeling of Extracellularly Recorded Action Potentials of Rat Heart Subepicardial Cardiomyocytes after Ischemia Reperfusion Injury. J Evol Biochem Physiol. 2023;59(5):1497-1509. doi:10.1134/S0022093023050046
9. Kubasov IV, Stepanov AV, Filippov YuA, Karnishkina OYu, Panov AA, Dobretsov MG. Extracellular Action Potentials of Ventricular Cardiomyocytes in the Heart Isolated From Rats Kept on a High-Fat/High-Sucrose Diet. J Evol Biochem Physiol. 2024;60(6):2281-2291. doi:10.1134/S0022093024060097

Сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ КАНАЛОВ PIEZO1 В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТЕНОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Гайнуллина Д.К.[1,2], Борзых А.А.[1], Печкова М.Г.[1], Богоцкой К.А.[1], Тарасова О.С.[1,2]

[1]ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия
[2]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Механические факторы играют важную роль в регуляции тонуса сосудов, а также в их ремоделировании при различных сердечно-сосудистых заболеваниях. Они реализуют свое влияние путем изменения состояния механочувствительных каналов в клетках сосудистой стенки. Исследования последних лет показали, что механочувствительные каналы Piezo1 в участвуют в функционировании сосудистой системы как в здоровом организме, так и при развитии различных патологий [1]. Следует отметить, что подавляющее число работ посвящено изучению роли Piezo1 в эндотелии сосудов, где они участвуют в реакциях эндотелий-зависимой вазодилатации [2,3]. Вместе с тем Piezo1 также содержатся в гладкомышечных клетках артерий [4].

Piezo1 представляют собой неселективные катионные каналы, проницаемые для Na^+, K^+ и Ca^{2+}[1]. Активация таких каналов в гладкомышечных клетках артерий может приводить к деполяризации мембраны, активации потенциал-управляемых Ca^{2+}-каналов T- и L-типов и развитию сократительных реакций при механических влияниях (формирование базального миогенного тонуса сосудов), а также действии различных агонистов. Однако роль каналов Piezo1 в регуляции сокращения артериальной гладкой мышцы практически не изучена.

Одной из распространенных патологий сердечно-сосудистой системы в преклонном возрасте является сужение (стеноз) сонных артерий вследствие формирования атеросклеротических бляшек [5]. Следует отметить, что изменения регуляции тонуса сосудов мозга при хроническом стенозе сонных артерий и их механизмы изучены мало. Показано, что сужение сонных артерий у крыс сначала приводит к гипоперфузии головного мозга, но спустя месяц происходит восстановление мозгового кровотока [6], что среди прочих причин может быть связано с уменьшением базального миогенного тонуса сосудов.

Данная работа была направлена на проверку гипотезы, что каналы Piezo1 участвуют в регуляции тонуса гладкомышечных клеток средней мозговой артерии и их функциональный вклад может изменяться при хроническом стенозе сонных артерий.

Материалы и методы исследования. В работе использовали самцов крыс Wistar, полученных из вивария ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Все процедуры, выполненные в исследованиях, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 648 от 28.09.2023).

В возрасте около 3 месяцев крысам на обе общие сонные артерии накладывали клипсы из серебряной ленты, контролем служили ложнооперированные крысы. Кровоток в сонных артериях наркотизированных крыс (золетил+ксилазин, по 12 мг/кг) измеряли с использованием флоуметра Transonic Systems с датчиком 1RB. В предварительных экспериментах было показано, что наложение клипсы приводит к уменьшению объемной скорости кровотока на 70-80%. в день операции и на 90% и более спустя 4 недели после.

Спустя 4 недели после операции по сужению сонных артерий проводили эксперименты на изолированных сосудах. Крыс анестезировали CO_2 и декапитировали, выделяли среднюю мозговую артерию. Для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме из артерий вырезали кольцевые сегменты длиной 2 мм и закрепляли их в миографе (620M, DMT, Дания). Удаление эндотелия проводили с помощью крысиного уса. Показания тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 10 Гц (АЦП E14 140, L CARD, Россия) и регистрировали при помощи программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). Эксперимент проводили в растворе, содержащем (в мМ): NaCl – 120; NaHCO3 – 26; KCl – 4.5; CaCl2 – 1.6; MgSO4 – 1.0; NaH2PO4 – 1.2; D-глюкоза – 5.5; EDTA – 0.025; HEPES – 5, pH=7,4. После нагрева препаратов до 37°C определяли растяжение, оптимальное для проявления сократительной активности артерий, затем проводили стандартную процедуру активации препаратов.

Основной протокол эксперимента заключался в последовательном проведении двух зависимостей «концентрация-эффект» на агонист рецепторов тромбоксана A2 U46619 (в диапазоне концентраций от 1 нМ до 3 мкМ, длительность действия каждой концентрации - 3 мин). Первую зависимость «концентрация-эффект» проводили спустя 20 мин после процедуры активации препарата. После отмывки от U46619 в один из каналов миографа добавляли Dooku1 (блокатор каналов Piezo1, 30 мкМ), а в другой канал - такой же объем растворителя (ДМСО), через 20 мин проводили вторую зависимость «концентрация-эффект» на U46619.

При обработке результатов из всех значений силы, зарегистрированных в течение эксперимента, вычитали значение «пассивной» силы, соответствующее полному расслаблению гладкой мышцы препарата, полученные значения активной силы выражали в

процентах от максимальной силы сокращения препарата в первой зависимости «концентрация-эффект».

Чувствительность артерий к U46619 оценивали по параметру pD2 (отрицательный логарифм EC50 – концентрации агониста, вызывающей реакцию, равную половине от максимальной) с использованием программы GraphPad Prism 9.5.1 (Калифорния, США). Чтобы сравнить эффекты Dooku1 на вызванное U46619 сокращение в артериях двух групп крыс, в программе GraphPad Prism 9.5.1 вычисляли значения площади под кривой (AUC).

Определение относительного содержания мРНК методом количественной ПЦР. Артерии быстро очищали от окружающей ткани, помещали в IntactRNA (Евроген, Россия) и хранили в нём при -20°C до выделения РНК. Образцы гомогенизировали в буфере RLT (Qiagen, Германия) с добавлением 1% β-меркаптоэтанола и протеиназы K (20 мг/мл, Евроген, Россия). Выделение РНК из образцов проводили на спин-колонках из набора для очистки препаратов суммарной РНК (CleanRNA Standard, Евроген, Россия). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), затем выравнивали ее во всех образцах и проводили обработку ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза кДНК использовали набор MMLV RT kit (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе DTlite 4 (ДНК-технология, Россия), используя готовую смесь для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I (5X qPCRmix-HS SYBR, Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

Анализ результатов проводили в программе RealTime PCR (ДНК-Технология, Россия). Уровни экспрессии целевых генов нормировали на экспрессию референсного гена *Actb* в том же образце.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 9.5.1. Соответствие распределения нормальному проверяли с применением критерия Шапиро-Уилка. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ или t-критерий Стьюдента. Различия считали статистическими значимыми при $p<0.05$. Все данные представлены как среднее ± ошибка среднего, n – количество животных в группе.

Результаты.

Влияние хронического стеноза сонных артерий на массу тела крыс и общие характеристики артерий мозга. Масса тела двух групп крыс в день проведения операции не различалась: «Контроль» – 368±10 г (n=17), «Стеноз» – 359±8 г (n=17), $p>0.05$ (непарный t-критерий Стьюдента). Спустя 4 недели после проведения операции масса животных в группах «Контроль» и «Стеноз» также не различалась и составила соответственно

400±12 г (n=17) и 372±13 г (n=17), p>0.05 (непарный t-критерий Стьюдента).

Максимальная сила сокращения препаратов средней мозговой артерии с удаленным эндотелием составила 6.4±0.7 мН (n=8) в группе «Контроль» и 7.5±0.6 мН (n=6) в группе «Стеноз» (p>0.05, непарный t-критерий Стьюдента). Уровень базального тонуса препаратов был ниже у животных группы «Стеноз» по сравнению с контрольными крысами: 39±7 % (n=6) и 58±4 % (n=8) от максимального уровня сокращения, соответственно (p<0.05). Сократительные ответы препаратов на U46619 не различались между группами.

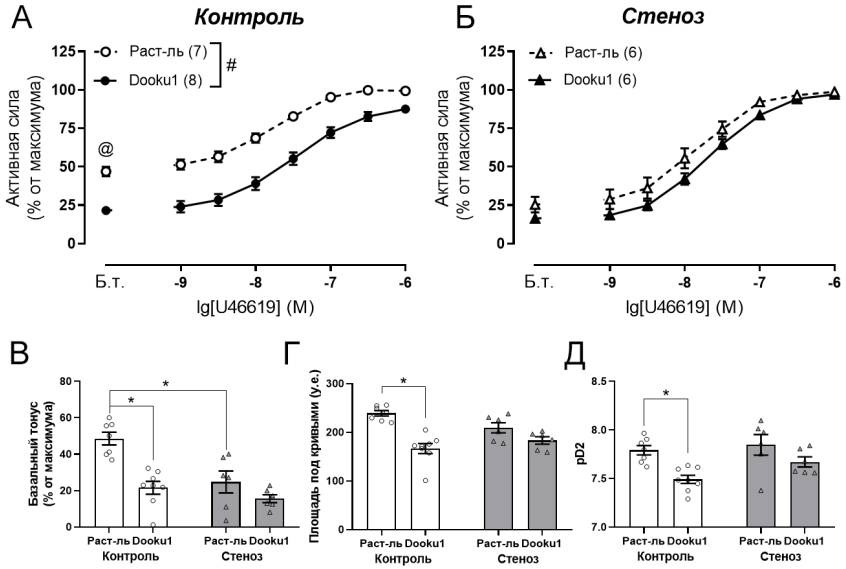


Рис. 1. Сократительные ответы средней мозговой артерии на U46619 у крыс групп «Контроль» (А) и «Стеноз» (Б) в присутствии блокатора Piezo1 (Dooku1, 30 мкМ) или эквивалентного объема растворителя. Уровни базального тонуса (В), площадей под кривыми (Г) и значения pD2 (Д) для сократительных ответов среднемозговой артерии на U46619 у крыс групп «Контроль» и «Стеноз» в присутствии блокатора Piezo1 (30 мкМ Dooku1) или эквивалентного объема растворителя, представленных на рисунках А и Б. Числа в скобках – количество животных в группах. @ p<0.05 (непарный t-критерий Стьюдента); # p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений); * p<0.05 (двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака).

Исследование вклада каналов Piezo1 в регуляцию уровня базального тонуса и сократительных ответов средней мозговой артерии. У контрольных крыс инкубация с блокатором каналов Piezo1 Dooku1 (30 мкМ) приводила к уменьшению уровня базального тонуса и сократительных ответов на U46619 по сравнению с влиянием растворителя (рис. 1А). Однако у крыс группы «Стеноз» ни уровень базального тонуса, ни сократительные ответы на U46619 не изменялись в присутствии Dooku1 (рис. 1Б). Следовательно, функциональный вклад Piezo1 каналов в регуляцию уровня базального тонуса и сократительных ответов на агонист рецепторов тромбоксана А2 в средней мозговой артерии крыс исчезает вследствие хронического стеноза сонных артерий.

Сравнение относительного содержания мРНК ионных каналов в средней мозговой артерии двух групп крыс. Методом ПЦР в реальном времени было показано, что содержание мРНК Piezo1 (рис. 2А) и Piezo2 (рис. 2Б) не различаются в артериях двух групп животных. Следовательно, снижение функционального вклада каналов Piezo1 в артериях крыс группы «Стеноз» не связано с изменением уровня экспрессии мРНК этих каналов в клетках артерий.

Далее в ткани артерий проводили сравнение содержания мРНК порообразующих субъединиц потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов. Оказалось, что содержание мРНК потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов L-типа не различается между двумя группами крыс (рис. 2В), в то время как содержание мРНК потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов Т-типа в артериях крыс группы «Стеноз» уменьшено по сравнению с артериями контрольных животных (рис. 2Г).

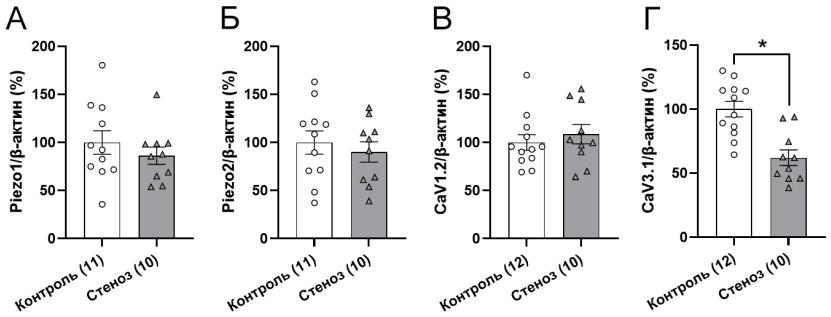


Рис. 2. Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц каналов Piezo1 (А), Piezo2 (Б), потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов L-типа (CaV1.2, В) и Т-типа (CaV3.1, Г) в средней мозговой артерии крыс групп «Контроль» и «Стеноз». Числа в скобках – количество животных в группах. * $p<0.05$ (непарный t-критерий Стьюдента).

Заключение. Впервые показано, что каналы Piezo1 обладают просократительным влиянием в артериях мозга крысы и такое влияние уменьшается при хроническом стенозе сонных артерий. Уменьшение уровня базального тонуса у крыс с хроническим стенозом может быть связано со снижением мембранного потенциала их гладкомышечных клеток, например, в силу уменьшения деполяризующего влияния Piezo1. Однако содержание мРНК Piezo1 в средней мозговой артерии крыс не изменяется при хроническом стенозе, что не исключает возможность снижения их экспрессии на белковом уровне. Вместе с тем наши данные указывают на то, что при хроническом стенозе сонных артерий может происходить снижение экспрессии потенциал-управляемых Ca^{2+} каналов Т-типа, которые являются одним из путей входа Ca^{2+} в гладкомышечные клетки артерий мозга, в том числе при развитии миогенного тонуса [7]. Таким образом, уменьшение просократительного влияния Piezo1 в артериях крыс со стенозом сонных артерий может быть связано с изменениями не самих Piezo1, а следующих этапов передачи сигнала к сократительному аппарату гладкомышечных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagase T., Nagase M. Piezo ion channels: long-sought-after mechanosensors mediating hypertension and hypertensive nephropathy // Hypertens. Res. Springer US, 2024. Bl 2786-2799.
2. Lhomme A. et al. Stretch-activated piezo1 channel in endothelial cells relaxes mouse intrapulmonary arteries // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2019. Vol 60, № 6. Bl 650-658.
3. Fei L. et al. Piezo1 Mediates Vasodilation Induced by Acute Hyperglycemia in Mouse Renal Arteries and Microvessels // Hypertension. 2023. Vol 80, № 8. Bl 1598-1610.
4. Zhang F.R. et al. Smooth muscle cell Piezo1 is essential for phenotypic switch and neointimal hyperplasia // Br. J. Pharmacol. 2025. № January 2024. Bl 1-18.
5. Dossabhoy S., Arya S. Epidemiology of atherosclerotic carotid artery disease // Semin. Vasc. Surg. Elsevier Ltd, 2021. Vol 34, № 1. Bl 3-9.
6. Mansour A. et al. A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats // J. Neurosurg. 2019. Vol 131, № 3. Bl 892-902.
7. Abd El-Rahman R.R. et al. Identification of L- and T-type Ca2+ channels in rat cerebral arteries: Role in myogenic tone development // Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol. 2013. Vol 304, № 1. Bl 58-71.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ ПИРАМИДНЫХ КЛЕТОК ПОЛЯ CA1 И ГРАНУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ФАСЦИИ ГИППОКАМПА ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИЯ

Галашин А.С., Конаков М.В., Дынник В.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Введение. На клеточном уровне патологическая гипервозбудимость нейронных сетей при эпилепсии, мигрени, болезни Альцгеймера и других нарушениях характеризуется ионным дисбалансом, связанным с накоплением ионов калия ($[K^+]_o$) в межклеточном пространстве, а также ионов натрия, кальция и хлора в цитоплазме клеток мозга [1-3]. Современные представления о молекулярных механизмах гипервозбудимости нейронных сетей при эпилептогенезе включают калиевую, мембранную (клеточную), ГАМК- и синаптическую (сетевую) модели [2-4]. В калиевой модели [4] причиной гипервозбудимости нейронных сетей считают рост $[K^+]_o$, приводящий к возникновению в сети положительной обратной связи, основанной на том, что увеличение $[K^+]_o$ вызывает уменьшение равновесного калиевого потенциала (E_{rev}), сдвигая потенциалы реверсии различных калиевых токов вправо в соответствии с законом Нернста, что вызывает деполяризацию нейронов. В мембранной (клеточной) модели [5] доминирование возбуждения над торможением обусловлено появлением групп пейсмейкерных глутаматергических нейронов, способных в патологических условиях спонтанно генерировать пачечные режимы и приводить к активации сетей. Очевидно, что объединение калиевой и мембранной моделей может обеспечить комбинированный эффект, основанный на прямом возбуждающем и опосредованном (через рост $[K^+]_o$) действии пейсмейкерных клеток на сеть. Однако механизмы, обеспечивающие накопление $[K^+]_o$ и пейсмейкерную активность, и конфигурации каналов, опосредующие соответствующие токи, исследованы недостаточно. Ранее нами было показано [8], что увеличение $[K^+]_o$ с 3 до 8.5 мМ (калиевая нагрузка) увеличивает индуцированную током пачечную активность глутаматергических нейронов (пирамидных клеток – PC) поля CA1 и подавляет индуцированную пачечную активность гранулярных клеток (GC) в зубчатой фасции (DG) гиппокампа мышей. Однако раздельное исследование электрофизиологических характеристик клеток

вентрального и дорсального гиппокампа нами не проводилось, что усредняло ответы. В данной работе такое раздельное исследование проведено, что позволило выявить гетерогенность ответов глутаматергических нейронов разных типов в вентральной и дорсальной частях поля CA1 и зубчатой фасции гиппокампа мышей.

Методы, материалы и статистический анализ. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов мышей линии SHK в возрасте 5-10 недель содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20-22°C (свет/темнота = 12 ч/12 ч). Эксперименты проводили на фронтальных срезах мозга мышей. В данной работе использован метод пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка», подробно описанный в работе [8]. Для индукции залповой активности к клетке прилагали ступеньки тока длительностью 500 мс и силой тока от -40 до +200 пА относительно потенциала покоя с шагом 10 пА. Определяли количество потенциалов действия (ПД) в ответ на каждую из ступенек тока, а также пороговый ток (I_{trh}), который определяли как минимальную силу тока, при которой возникал хотя бы один ПД. Потенциал покоя (V_m) определяли в рамках этого же протокола при отсутствии стимуляции (0 пА). Статистическую обработку данных проводили в GraphPad Prizm 8.0 (GraphPad Software, США). Данные анализировали с помощью парного *t*-критерия и двухфакторного анализа ANOVA с повторными измерениями (two-way repeated measures ANOVA) с апостериорным критерием Шидака. Значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Количество клеток (*n*) указано на соответствующих рисунках. В работе использовали реактивы Sigma (США) и Tocris (Великобритания).

Результаты. *Вызванная пачечная активность при стимуляции нейрона ступенькой тока.* Примеры вызванной пачечной активности при стимуляции ступенькой тока пирамидного нейрона дорсальной части поля CA1 показаны на рис. 1. Видно, что увеличение амплитуды ступеньки тока приводит к увеличению числа вызванных потенциалов действия, характеризуя возбудимость РС при деполяризации мембраны клетки. При силе тока 200 пА число импульсов в пачке достигает 10, что соответствует частоте вызванной импульсной активности 20 Гц. Далее, для того чтобы выявить различие возбудимости нейронов, нами был использован двухпараметрический анализ, сочетающий вариации амплитуды тока и изменения $[K^+]_o$ с 3 до 8.5 мМ (калиевая нагрузка).

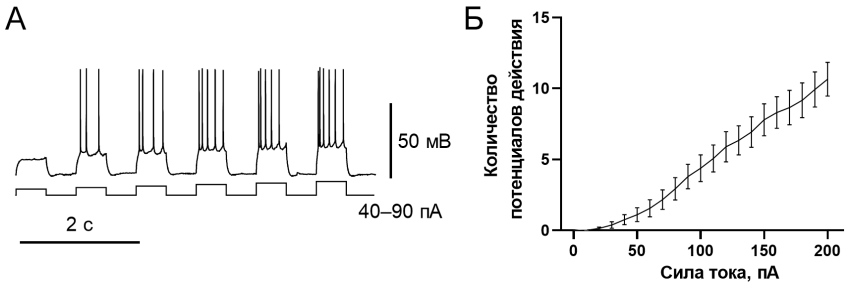


Рис. 1. Индукция залповой активности в пирамидных нейронах дорсальной части поля CA1. А – Индукция залповой активности ступеньками тока длительностью 500 мс и силой тока от +40 до +90 пА относительно потенциала покоя с шагом 10 пА при 3 мМ KCl. Б – Кривые зависимости количества вызванных потенциалов действия от силы стимуляции током (от 0 до +200 пА). Данные представлены как среднее ± SEM.

Сравнительный двухпараметрический анализ возбудимости PC и GC вентральной и дорсальной частей поля CA1 и DG при вариации амплитуды деполяризующего тока и калиевой нагрузке. Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что раздельное двухпараметрическое исследование электрофизиологических характеристик позволяет выявить гетерогенность ответов глутаматергических нейронов разных типов в вентральной и дорсальной частях поля CA1 и зубчатой фасции гиппокампа мышей. В вентральных пирамидных клетках поля CA1 наблюдается выраженная активация калием пачечной активности нейронов при любой амплитуде деполяризующего тока (рис. 2Б). При токах порядка 200 пА частота импульсной активности может достигать 30 Гц (15–16 импульсов за 500 мс). В дорсальных PC активация калием наблюдается только при токах от 40 до 100 пА, а при больших деполяризующих токах наблюдается даже некоторое снижение импульсной активности при увеличении $[K^+]_o$ (рис. 2А). Сходный эффект имеет место и вентральных гранулярных клетках DG, в которых подавление пачечной активности в присутствии 8.5 мМ K^+_o выражено достоверно (рис. 2Г). Парадоксальный эффект калиевой нагрузки наблюдается в дорсальных GC зубчатой фасции (DG), в которых увеличение $[K^+]_o$ с 3 до 8.5 мМ полностью подавляет вызванную импульсную активность (рис. 2В).

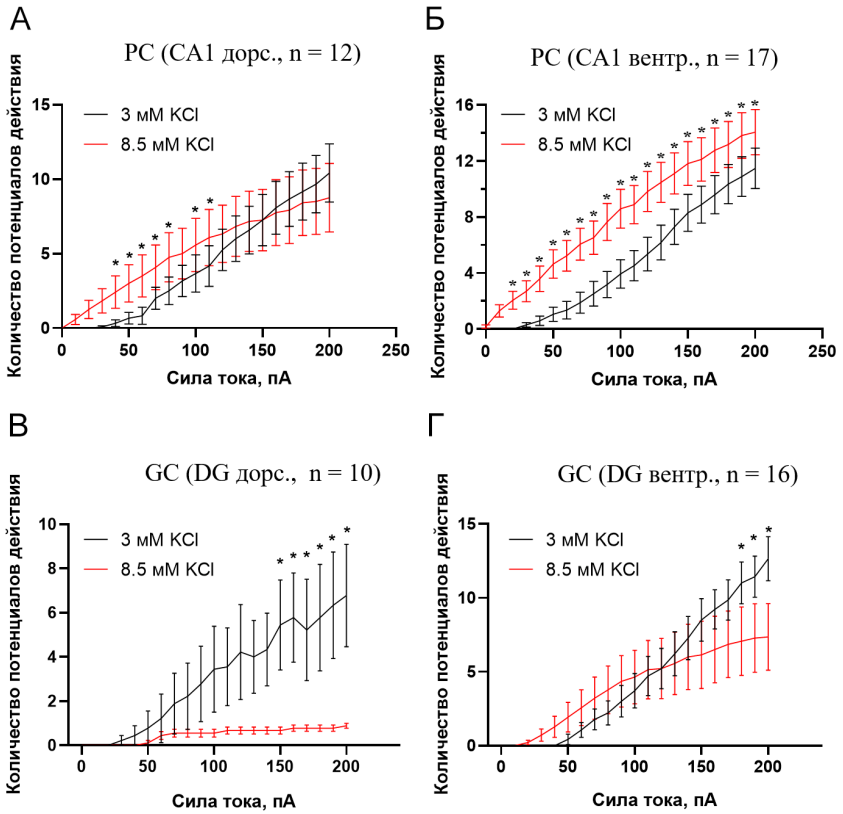


Рис. 2. Влияние повышения концентрации калия в среде (KCl) с 3 до 8.5 мМ на вызванную пачечную активность пирамидных (PC) и гранулярных (GC) нейронов вентральной (вентр.) и дорсальной (дорс.) частей поля CA1 и зубчатой фасции (DG). Число клеток в каждом эксперименте (n) указано на рисунках. Пояснения в тексте. Использован двухфакторный анализ ANOVA с повторными измерениями ($p < 0{,}0001$) и апостериорный критерий Шидака (* $p < 0{,}05$). Данные представлены как среднее ± SEM.

Обсуждение. В работе показано, что калиевая нагрузка увеличивает индуцированную током пачечную активность PC только в вентральной части поля CA1, подавляет индуцированную пачечную активность только дорсальных GC DG и не оказывает заметного влияния на вызванную пачечную активность дорсальных PC поля CA1 и вентральных GC DG. Высокая чувствительность вентральных пирамидных клеток поля CA1 к калиевой нагрузке в сравнении с дорсальными гранулярными клетками

DG может играть важную роль в гипервозбуждении нейронных сетей при эпилептогенезе. Спонтанная пейсмейкерная активность, индуцируемая калиевой нагрузкой, зарегистрирована нами ранее только в вентральных РС поля CA1 [8], что также свидетельствует в пользу этого утверждения. Такие пейсмейкерные пирамидные клетки обнаружены в полях CA1-CA3 гиппокампа в моделях эпилептогенеза у животных [5,6] и у пациентов с эпилепсией [7]. Поэтому исследование влияния калиевой нагрузки на наличие спонтанно-активных пейсмейкерных клеток в вентральной части поля CA1 на различных моделях эпилептогенеза вызывает определенный интерес. В работе [8] раздельное исследование различных электрофизиологических характеристик клеток вентрального и дорсального гиппокампа нами не проводилось, что усредняло ответы. Доминирующими были характеристики, представленные на рис. 2Б и 2В. Подавление вызванной импульсной активности в гранулярных клетках DG калиевой нагрузкой может свидетельствовать о высокой устойчивости клеток DG при гиперактивации нейронных сетей и индукции эпилептогенеза. В данной работе такое раздельное исследование проведено, что позволило выявить гетерогенность ответов глутаматергических нейронов разных типов в вентральной и дорсальной частях поля CA1 и зубчатой фасции гиппокампа мышей. Поэтому необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на выявление и классификацию характерных электрофизиологических ответов гранулярных и пирамидных клеток различных отделов гиппокампа. Очевидно, что в условиях большой гетерогенности определяющим может стать фармакологический, а не ПЦР-анализ для выявления характерных конфигураций каналов (токов), обеспечивающих низкую или, наоборот, высокую чувствительность клеток разных типов к калиевой нагрузке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shao J., Liu Y., Gao D., Tu J., Yang F. 2021. Neural Burst Firing and Its Roles in Mental and Neurological Disorders. Front. Cell. Neurosci., 15, 741292. doi 10.3389/fncel.2021.741292.
2. Raimondo J.V., Burman R.J., Katz A.A., Akerman C.J. 2015. Ion dynamics during seizures. Front. Cell. Neurosci., 9, 419. doi 10.3389/fncel.2015.00419.
3. Antonio L.L., Anderson M.L., Angamo E.A., Gabriel S., Klaft Z.-J., Liotta A., Salar S., Sandow N., Heinemann U. 2016. In vitro seizure like events and changes in ionic concentration. J. Neurosci. Methods, 260, 33–44. doi 10.1016/j.jneumeth.2015.08.014.
4. Fertziger A.P., Ranck J.B. 1970. Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. Exp. Neurol., 26, 571–585. doi 10.1016/0014-4886(70)90150-0.

5. Traynelis S.F., Dingledine R. 1988. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. J. Neurophysiol., 59, 259–276. doi 10.1152/jn.1988.59.1.259.
6. Pan E., Stringer J.L. 1997. Role of potassium and calcium in the generation of cellular bursts in the dentate gyrus. J. Neurophysiol. 77, 2293–2299. doi 10.1152/jn.1997.77.5.2293.
7. Hofer K.T., Kandrács Á., Tóth K., Hajnal B., Bokodi V., Tóth E.Z., Erőss L., Entz L., Bagó A.G., Fabó D., Ulbert I., Wittner L. 2022. Bursting of excitatory cells is linked to interictal epileptic discharge generation in humans. Sci. Rep., 12, 6280. doi 10.1038/s41598-022-10319-4.
8. Галашин А.С., Конаков М.В., Дынник В.В. Сравнение спонтанной и вызванной активности пирамидных клеток поля CA1 и гранулярных клеток зубчатой извилины гиппокампа при увеличении внеклеточной концентрации калия. Биологические мембраны. 2025. Т. 42. № 1. С. 61–70.

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНАНА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АФФЕРЕНТОВ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ, ВЫЗВАННУЮ АГОНИСТАМИ P2X- И TRPV1 РЕЦЕПТОРОВ

Гилиждинова К.Р.[1], Ананьев А.С.[1], Петров А.М.[2,3], Ситдикова Г.Ф.[1]

[1]Кафедра человека и животных, Казанский федеральный университет, Казань, Россия
[2]Лаборатория биофизики и синаптических процессов, Казанский Институт биохимии и биофизики, Казань, Россия
[3]Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Введение. Мигрень, связанная с гиперактивацией тригеминоваскулярной системы, остается сложной медицинской проблемой из-за ограниченной эффективности существующих терапий. Предполагается, что активация тройничного нерва ведет к субъективному ощущению боли при мигрени. За активацию ноцицептивных окончаний афферентов тройничного нерва отвечают различные рецепторы, включая пуриновые, серотониновые, TRPV1 рецепторы. Большинство из них ассоциированы с липидными рафтами [1-2]. Согласно литературным данным, TRPV1-рецепторы в большей мере ассоциированы с липидными рафтами, чем P_2X рецепторы [3]. Было показано, что метил-β-циклодекстрин (МЦД), способный разрушать липидные рафты за счет удаления мембранного холестерина, уменьшает капсаицин-вызванные кальциевые транзиенты в культуре нейронов тройничного ганглия [4].

Целью данной работы являлось изучить эффект метил-β-циклодекстрина на электрическую активность афферентов тройничного нерва.

Методология. Для регистрации электрической активности афферентов тройничного нерва с помощью внеклеточного электрода использовали препарат получерепа крысы линии Wistar (P30-40). Метил-β-циклодекстрин (МЦД, 0.1 и 1 мМ), АТФ (100 мкМ) и капсаицин (1 мкМ) растворялись в растворе Кребса. Растворы апплицировались непосредственно в область иннервации афферентов тройничного нерва средней менингеальной артерии. Спонтанная активность афферентов тройничного нерва до и после аппликации веществ записывалась при постоянной перфузии препарата раствором Кребса следующего состава (mM): 115 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl2, 1 MgCl2, 1 NaH2PO4, 25 NaHCO3, и 11 глюкозы, pH 7.2 - 7.3.

Для исследования влияния МЦД на нейроны была использована первичная культура нейронов тройничного ганглия из крыс P7-14. Всего было использовано 5 животных, выборка в каждой группе составила 3 животных. На следующий день после получения культуры, нейроны инкубировались в растворе с МЦД с концентрацией 0.1 мМ в течение 20 минут, после чего окрашивались β-субъединицой холерного токсина (CTxB), конъюгированной с Alexa Fluor 488. CTxB способен селективно связываться с ганглиозидом M1, преимущественно расположенным в липидных плотах. Анализ данных проводился путем подсчета среднего значения свечения ROI (тела нейронов). Также производился подсчет количества нейронов с окрашенными отростками.

Полученные данные представлены в виде среднего значения с указанием ошибки среднего значения: mean ± SE, n указывает на количество препаратов получерепа или количество нейронов в первичной культуре.

Результаты. В контрольной группе базовая электрическая активность отростков тройничного нерва составила 139 ± 36 ПД за 5 минут регистрации (n = 10, рис. 1). В первые 5 минут аппликации АТФ частота возникновения ПД увеличилась до 485% и составила 499 ± 80 ПД (n=12, $p < 0.005$, рис. 1). При дальнейшей аппликации раствора с капсаицином, активатора TRPV1 каналов, количество ПД в первые 5 минут аппликации выросло до 1306% и составило 1588 ± 179 ПД ($p < 0.005$). Всего за 20 минут записи количество ПД составило 458 ± 57 в контроле, 1879 ± 269 при аппликации АТФ и 1693 ± 166 при 10-минутной аппликации капсаицина (рис.1В-Г).

При инкубации препарата в растворе, содержащем в МЦД в концентрации 0.1 мМ, электрическая активность не изменилась по сравнению с базовой активностью: 208 ± 60 ПД и 204 ± 48 ПД за 5 минут регистрации, соответственно (n=7, $p>0.05$). На фоне МЦД аппликация АТФ повысила активность, и ее пиковая активность составила 278 ± 80 ПД за 5 мин, что составило 240% прироста относительно базовой активности. Дальнейшая аппликация капсаицина привела к небольшому увеличению ПД и составила 358 ± 61 ПД за 5 минут регистрации, что составило 169% прироста относительно контроля. Всего за 20 минут записи количество ПД составило 756 ± 160 в контроле, при аппликации МЦД 824 ± 236, 881 ± 259 при аппликации АТФ и 558 ± 90 при 10 минутной аппликации капсаицина.

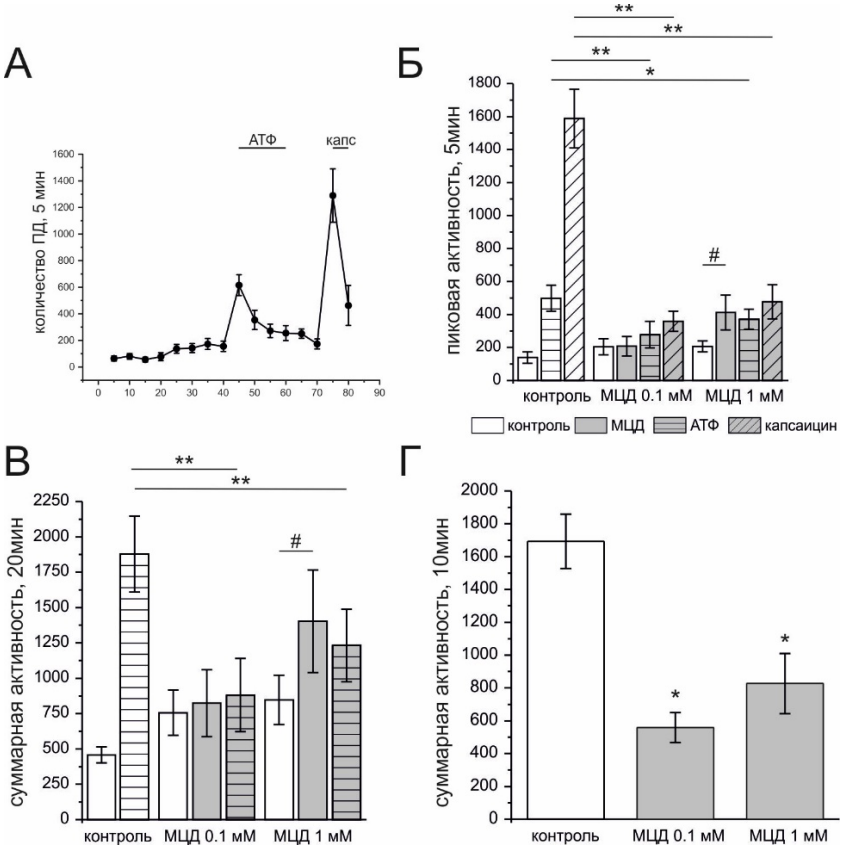


Рис. 1. Влияние метил-β-циклодекстрина на электрическую активность афферентов тройничного нерва крысы. А: количество ПД за 5 минут при действии АТФ (100 мкМ) и капсаицина (капс, 1 мкМ); Б: пиковая активность афферентов тройничного нерва при действии АТФ и капсаицина (белые столбцы – контроль, серые – при действии МЦД); В: суммарная активность афферентов тройничного нерва за 20 минут при действии МЦД и АТФ; Г: суммарная активность афферентов тройничного нерва за 10 минут при действии капсаицина, где, * и # $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Инкубации препарата получерепа в растворе с МЦД с концентрацией 1 мМ привела к увеличению спонтанной электрической активности, которая составила 412 ± 106 ПД по сравнению с базовой активностью в 208 ± 34 ПД за 5 мин (n=7). Данный прирост составил 201% относительно базовой активности. Дальнейшая аппликация АТФ не привела к увеличению активности, количество ПД составило 371 ± 61.

Аппликация капсаицина также не привела к увеличению активности: количество ПД составило 477 ± 104 за 5 минут регистрации. Всего за 20 минут записи количество ПД составило 847 ± 175 в контроле, при аппликации МЦД 1402 ± 363, 1231 ± 257 при аппликации АТФ и 826 ± 183 при 10 минутной аппликации капсаицина.

Инкубация нейронов тройничного ганглия в растворе, содержащем МЦД, приводила к снижению свечения CTxB на телах нейронов и снижению количество нейронов с окрашенными отростками (рис. 2Б). В контроле количество нейронов с окрашенными отростками составило 20.2% (162/804 нейрона) и после инкубации в МЦД (0.1 мМ) - 3.6% (17/475 нейронов, рис. 3Б). Среднее значение свечения CTxB составило: 43.1 ± 0.5 у.е. в контроле и 28.6 ± 0.4 у.е. после инкубации в МЦД (рис. 2В).

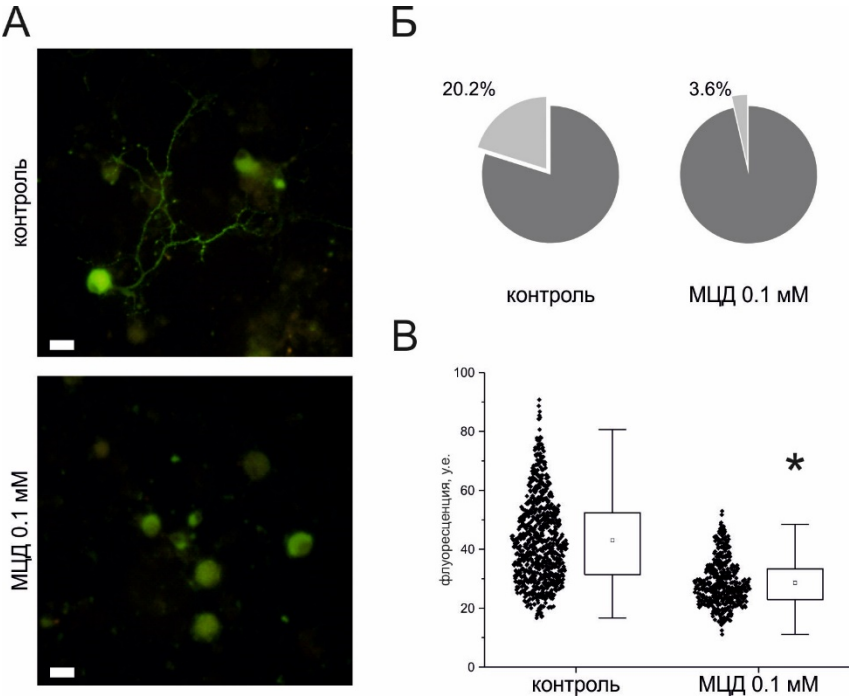


Рис. 2. Влияние метил-β-циклодекстрина (МЦД) на связывание β-субъединицы холерного токсина с ганглиозидом М1 на культуре нейронов тройничного ганглия. А: общий вид нейронов в контроле и после 20-минутной инкубации в МЦД 0.1 мМ, 25 μm; Б: процентное соотношение нейронов с окрашенными отростками в контроле и после инкубации МЦД; С: средняя интенсивность флуоресценции CTxB, где * $p < 0.05$.

Заключение. Таким образом, МЦД в концентрациях 0.1 мМ и 1 мМ предотвращает усиление электрической активности нерва при действии капсаицина, антагониста TRPV1 рецепторов, что, по-видимому, обусловлено дезорганизацией липидных рафтов, что было подтверждено флуоресцентным анализом β-субъединицы холерного токсина. МЦД в концентрации 1 мМ оказывал собственное активирующее действие и повышал частоту спайкования нерва. Проноцицептивное действие АТФ обусловлено активацией ионотропных P2X3/2 рецепторов, которые ассоциированы с липидными рафтами в меньшей степени. Поэтому при действии МЦД в концентрации 0.1 мМ наблюдался небольшой прирост количества ПД в ответ на аппликацию АТФ, тогда как МЦД в концентрации 1 мМ предотвращал активирующее действие АТФ. Таким образом, целостность липидных рафтов является существенным фактором, определяющим функциональную активность TRPV1 и P2X3/2 рецепторов в афферентах тройничного нерва.

Данный проект был выполнен при поддержке программы стратегического академического лидерства «ПРИОРИТЕТ-2030».

ЛИТЕРАТУРА

1. Murrell-Lagnado, R. D. Regulation of P2X purinergic receptor signaling by cholesterol. Current topics in membranes. 2017;80:211-232.
2. Sághy, É., Szőke, É., Payrits, M., Helyes, Z., Börzsei, R., Erostyák, J., Szolcsányi, J. Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca2+-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. Pharmacological research. 2015;100:101-116.
3. Liu, M., Huang, W., Wu, D., & Priestley, J. V. TRPV1, but not P2X3, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. European Journal of Neuroscience. 2006;24(1):1-6.
4. Szőke, É., Börzsei, R., Tóth, D. M., Lengl, O., Helyes, Z., Sándor, Z., & Szolcsányi, J. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. European journal of pharmacology. 2010; 628(1-3):67-74.

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ Na^+ В ЦИТОЗОЛЕ СПОСОБСТВУЕТ ДЛИТЕЛЬНОМУ ПОТЕНЦИАЛУ ДЕЙСТВИЯ И НЕСТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОКОЯ В МИОКАРДЕ ПРОКСИМАЛЬНОЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ У КРЫС

Егоров Ю.В.[2], Иванова А.Д.[1], Филатова Т.С.[1,2], Воронина Я.А.[1], Пустовит О.Б.[1], Кархов А.М.[1,2], Кузьмин В.С.[1,2]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра физиологии человека и животных, Москва, Россия
[2]Лаборатория электрофизиологии сердца, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, Москва, Россия

1. Введение. Известно, что миокардиальная ткань в стенке торакальных вен возбудима, способна генерировать потенциалы действия (ПД), демонстрирует способность проводить волну возбуждения по т.н. миокардиальному «рукаву» [1]. Из-за предрасположенности к эктопическому автоматизму и аномальному проведению возбуждения миокард торакальных вен рассматривается как источник проаритмической активности, приводящей к фибрилляции предсердий [2]. В 20% случаев источники профибрилляторной активности располагаются в миокарде верхней полой вены (ВПВ) [3]. Считается, что аномальный трансмембранный транспорт ионов K^+ [5], Na^+ [6], Cl^- [7] и колебания $[Ca^{2+}]_i$ являются факторами, влияющими на проведение волны возбуждения в легочных венах (ЛВ) [8]. Натрий-кальциевый обменник (NCX) является основным посредником, связывающим внутриклеточную динамику Ca^{2+} и проаритмические мембранные явления - нестабильность потенциала покоя (МПП), спонтанные ПД в ЛВ [9]. Известно также, что NCX работает в тесном взаимодействии с Na^+/K^+-АТФазой (NKA) [10]. Поскольку NKA играет основную роль в поддержании $[Na^+]_i$ и МПП в сердечных клетках, изменение функционирования Na^+/K^+-насоса может быть существенным фактором, опосредующим аритмогенную электрофизиологию миокарда не только легочных, но и полых вен [11].

В настоящем исследовании мы изучили роль NCX, NKA и $[Na^+]_i$ в проаритмическом изменении конфигурации ПД, нестабильности МПП, наблюдаемом в миокарде полых вен.

2. Материалы и методы.

2.1. Животные. Все экспериментальные процедуры проводились на крысах самцах Wistar весом 280–320 г. в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Совет Европы № 123, Страсбург, 1985 г.) и одобрены Этическим комитетом Института

экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова МЗ РФ. Протоколы препарирования, и подготовки препаратов описаны в работах [4] [7].

2.2. Для регистрации электрофизиологических характеристик ПД использовалась стандартная техника микроэлектродных отведений.

2.3. Характер возбуждения ВПВ анализировали с использованием оптического картирования, основанного на флуоресценции потенциалчувствительного зонда di-4-ANEPPS [4].

2.4. Ток натрий-кальциевого обменника (I_{NCX}) регистрировался с помощью метода whole-cell патч-кламп. Энзиматическую изоляцию миоцитов из верхней полой вены крысы осуществляли по методу Р. Бонда и Э. Джеймса. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США).

2.5. Сдвиг $[Na^+]_i$ определяли по изменению флуоресценции Na^+-зонда в изолированных кардиомиоцитах ВПВ (ANG-2, 5 мкМ) в течение 20 мин при комнатной температуре (25 °C).

2.6. Оценку относительного уровня экспрессии мРНК Na^+/K^+-АТФазы (Atp1a1) и Na^+/Ca^{2+}-обменника (Slc8a1, NCX1) в миокарде ВПВ и левого предсердия (ЛП) проводили с помощью стандартного РВ-ПЦР с использованием прямых и обратных праймеров.

2.7. Все данные в тексте и на рисунках, за исключением исходных записей, представлены как ср.±ст.откл. для n экспериментов. Для статистического анализа данных использовался GraphPad Prism 7. Проверка гипотез проводилась с использованием t-критерия, теста Манна-Уитни (MW) или однофакторного дисперсионного анализа, где это было приемлемо. Значение $p<0,05$ считалось статистически значимым.

3. Результаты.

3.1. ДПД и его поздняя фаза реполяризации в миокарде ВПВ. Длительность электрически вызванных ПД (ДПД) значимо меньше в ЛП по сравнению с ВПВ: $ДПД_{90}$ составила 26,6±4,3 (n=12) и 35,3±10,1 (n=8) мс в трабекулярной части ЛП и сердечной ткани, прилегающей к устью ВПВ, соответственно ($p<0,05$, n=10) (рис. 1А). Разница в ДПД обусловлена поздней фазой реполяризации. Значимых различий в $ДПД_{70}$ между тканями не выявлено. Продолжительность поздней фазы ПД ($ДПД_{90-70}$) была значительно короче в ЛП, чем в ВПВ, если рассчитывать в абсолютных значениях (11,1±2,4 против 16,6±4,1 мс, $p<0,05$) или относительное значение $ДПД_{90-70}$ (41,6±5,5 против 47,9±5,9%, $p<0,05$. рис. 1Б).

3.2. Нестабильность МПП в миокарде ВПВ. Прекращение электрической стимуляции приводит к спонтанному и быстрому сдвигу МПП к менее электронегативным значениям в ВПВ (от −79±2 мВ до −68±3 мВ, $p<0,01$, n=15) в течение 1 мин (рис. 1В, верхняя панель).

Увеличение периода покоя >1 мин стабилизировало МПП на уровне −65±4 мВ (n=15). В ЛП не наблюдалось сдвига МПП в ответ на прекращение электрической стимуляции. Возобновление стимуляции приводит к постепенному восстановлению МПП в течение 5-10 мин в ВПВ. Скорость фронта ПД значительно снижена при после периода покоя (230±20 во время возобновления стимуляции по сравнению с 285±25 В/с при непрерывной стимуляции, n=15, p<0,01) в ВПВ, но не в ЛП (рис. 1В, нижняя панель).

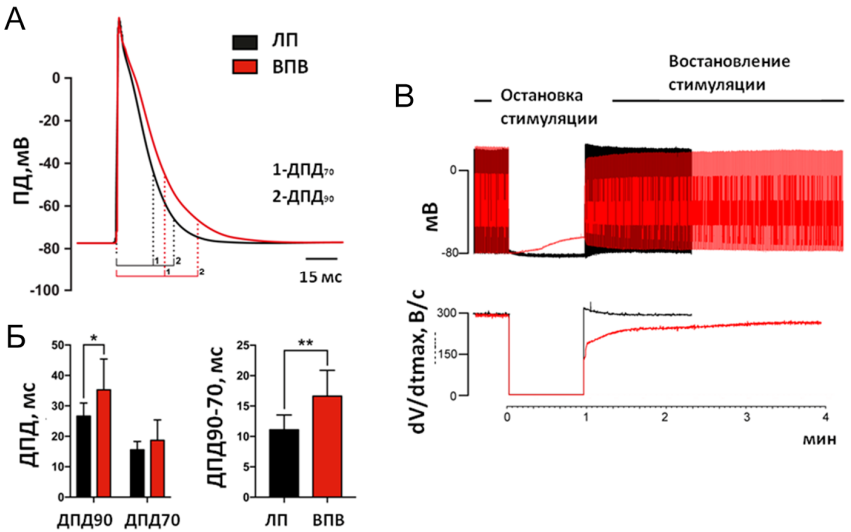


Рис. 1. А. Примеры ПД в ЛП и ВПВ. Б. ДПД на уровне 70% и 90% реполяризации ($ДПД_{70}$ и $ДПД_{90}$ соответственно) и длительность поздней фазы ПД ($ДПД_{90-70}$) в ЛП и ВПВ. * - p=0,02, ** - p=0,005 (t-критерий). В. МПП в ВПВ крысы (красный) и в ЛП (черный). Показательные изменения МПП (верхняя панель) в ВПВ и в ЛП после прекращения стимуляции. Покой. – 1 мин интервал покоя.

3.3. Флюоресценция цитозольного Na^+ в кардиомиоцитах ВПВ. Прекращение электрической стимуляции приводило к увеличению флюоресценции зонда ANG-2, пропорциональной $[Na^+]_i$, в кардиомиоцитах проксимальной части ВПВ. В предсердном миокарде не наблюдалось существенного роста флюоресценции ANG-2, через 1 мин после прекращения стимуляции (рис. 2А,Б).

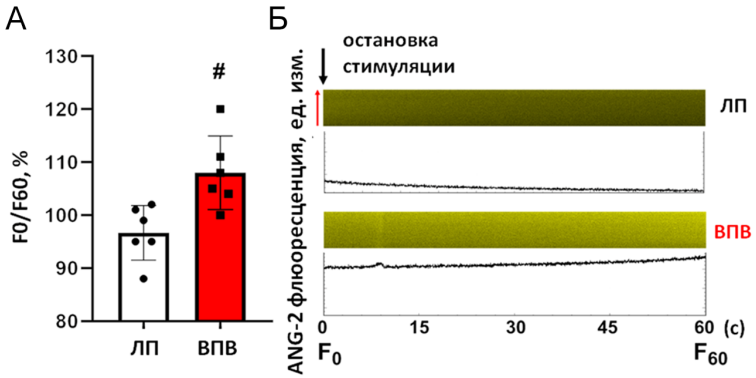


Рис. 2. А. Относительная флуоресценция натрий-зависимого пигмента в кардиомиоцитах ЛП и ВПВ через 1 мин после прекращения стимуляции. Б. Показательные изображения (вверху) и диаграммы (внизу), показывающие снижение в ЛП и увеличение в ВПВ флуоресценции ANG-2 (желтый псевдоцвет) в течение минуты после прекращения стимуляции (справа). Красная стрелка – линия сканирования. # - $p<0,05$ (MW-тест).

3.4. Влияние внешнего Li^+ на электрофизиологические параметры. Частичная замена натрия Li^+ (30 мМ) во внеклеточном растворе вызывает дополнительный сдвиг МПП в покоящемся миокарде ВПВ (–68±3 и -55 мВ в контроле и с Li^+, n=6, $p<0,05$, рис. 3А). В ЛП не наблюдалось существенного сдвига МПП в присутствии Li^+ (30 мМ). Перфузия миокарда ВПВ раствором, содержащим Li^+, сопровождалась потерей возбудимости. Замена раствора, содержащего Li^+, на контрольный, восстановила МПП и возбудимость в ВПВ. Перфузия раствором с Li^+, вызывала удлинение ПД в ВПВ и ЛП. Удлинение, вызванное Li^+, было значимым в ВПВ (17±3%, n=5, $p<0,05$).Во всех экспериментах (n=5) перфузия раствором с Li^+, вызывала блок проведения возбуждения в ВПВ. Блок проведения возникал в проксимальной части ВПВ вблизи устья вены (рис. 3Б).

3.5. I_{NCX} в кардиомиоцитах и сердечной ткани ВПВ. Кардиомиоциты, изолированные из ВПВ, демонстрируют ток I_{NCX}, который имеет типичную I-V характеристику. Выходящий компонент I_{NCX} в ВПВ при +20 мВ составил 4,2 ± 0,4 пА/пФ, а выпрямленный входящий компонент при -70 мВ составил -0,39 ± 0,04 пА/пФ (n = 7. рис. 4А). Как выходящий, так и входящий компоненты I_{NCX} были значительно меньше в кардиомиоцитах из ЛП, чем из ВПВ: 0,84 ± 0,05 пА/пФ (при +20 мВ) и -0,27 ± 0,03 пА/пФ (при -70 мВ, n = 9) соответственно (рис. 4Б).

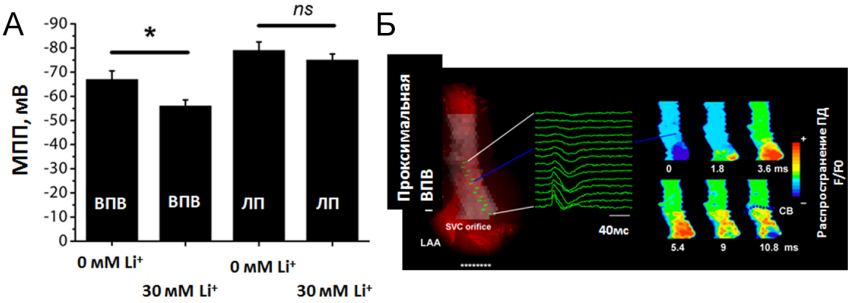


Рис. 3. Влияние Li^+ на миокард ВПВ. А. Стационарный уровень МПП в покоящемся препарате ВПВ и ткани ЛП в растворах без Li^+ и с Li^+ (30 мМ). * - $p<0,05$ (тест MB). Б. Характерный пример блока проведения (БП) в ВПВ, возникшего с частичной заменой Na^+ на Li^+ во внеклеточном растворе. Область картирования и отдельные оптические сигналы (ПД, зеленые) из картированной области показаны слева. Синяя линия разграничивает области с оптическими ПД и пассивным электротоническим ответом. Последовательные кадры цикла возбуждения, показывающие активированную ткань и зону блока в проксимальной части ВПВ, показаны справа.

Потенциал реверсии для I_{NCX} из ВПВ составил -46±3 (n=7) мВ, тогда как E_{NCX} в предсердных кардиомиоцитах был менее отрицательным: -17±2 мВ ($p<0,05$, n=9). Значительно повышенный $[Na^+]_i$ может лежать в основе наблюдаемой разницы в E_{NCX} в условиях, когда $[Ca^{2+}]i$, $[Ca^{2+}]out$, $[Na^+]out$ и $[Na^+]pip$ остаются постоянными. Предполагая стехиометрию 3 Na^+: 1 Ca^{2+}, грубая оценка на основе уравнения (1) дает стационарное значения $[Na^+]_i$=14±1,1 мМ в ВПВ и $[Na^+]_i$ =9±0,7 мМ в кардиомиоцитах ЛП с 1,55-кратной разницей между двумя типами клеток. Введение ингибиторов «обратного» режима работы NCX SN-6 (10 мкМ, n=6) и KB-R7943 (10 мкМ, n=6), а также применение бензамила (10 мкМ, n=6) приводило к сдвигу МПП к менее электронегативным значениям в покоящейся ткани ВПВ (рис. 4В), перфузируемых стандартным раствором Тироде с $[Ca^{2+}]$=1,8 и $[Na^+]$=145 мМ. После введения ингибиторов NCX МПП в покоящейся ВПВ стабилизируется на уровне -64±3, -57±5 мВ.

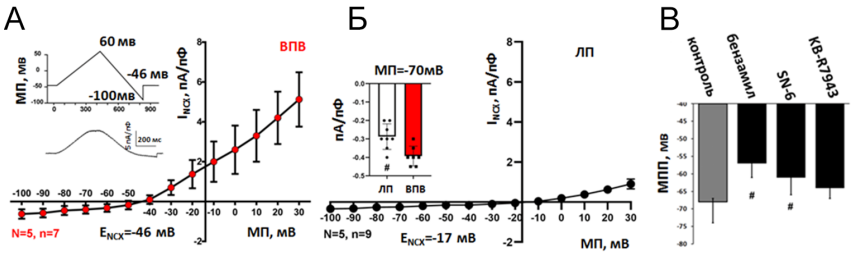


Рис. 4. Характеристики тока I_{NCX} и его вклад в МПП в миокарде ВПВ. А. I-V-кривая для I_{NCX} в миокарде ВПВ при буферизованном $[Ca^{2+}]i$=199 нМ, ($[Ca^{2+}]out$=1,8, $[Na^{+}]out$=145 мМ). Протокол напряжения (вверху) и репрезентативная кривая I_{NCX} (внизу) показаны на вставке. Б. То же, что и на А, но для миокарда ЛП. I_{NCX} в ВПВ и ЛП, измеренный при -70 мВ, показан на вставке. В. МПП в контроле и пи действии блокаторов NCX в ВПВ. Количество животных (N) и количество использованных кардиомиоцитов (n) показано на каждой панели. # - $p < 0,05$ (тест MB или однофакторный ANOVA).

3.6. Экспрессия транскриптов NCX и α1 субъединицы NKA в миокарде ВПВ. Не было обнаружено существенных различий в уровне транскриптов гена *Slc8a1*, кодирующего основную субъединицу NCX1, между миокардом предсердий и полых вен. Однако экспрессия транскриптов гена *Atpa1a1*, кодирующего α1-субъединицу NKA, была значительно снижена в ткани ВПВ по сравнению с ЛП (рис. 5).

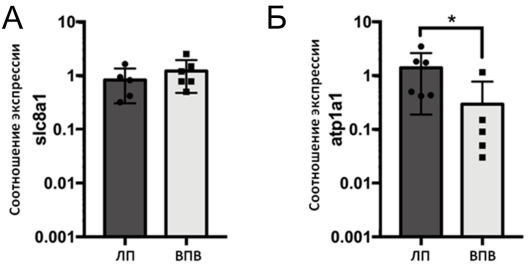


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии транскриптов Slc8a1 (NCX1) и Atp1a1 (субъединица транспорта- α1 АТФазы Na^{+}/K^{+}) в ЛП и ВПВ крысы. Все значения нормализованы по hprt и tpb и показаны в логарифмической шкале. Среднее ±СО. * - $p<0,05$ (MB-тест).

4. Обсуждение. В этом исследовании мы впервые продемонстрировали, что флуоресценция Na^{+}-чувствительного красителя значительно увеличилась в цитозоле покоящихся кардиомиоцитов из

ВПВ, но не в ЛП, что соответствует повышению $[Na^+]_i$ в ВПВ. Причины, лежащие в основе увеличения $[Na^+]_i$ и продления поздней фазы ПД в проксимальной части ВПВ, остаются неясными. Накопление $[Na^+]_i$ может быть результатом не только I_{Na}, но и сниженной активности Na^+/K^+-АТФазы. Наши результаты также позволяют предположить, что сниженная экспрессия α1-субъединицы NKA, влияет на проведение возбуждения в миокарде ВПВ. Мы продемонстрировали, что частичная замена ионов Na^+ на Li^+ во внеклеточном растворе вызывает удлинение ПД, значительный сдвиг МПП к менее отрицательным значениям в ВПВ, но не в ЛП. Таким образом, нарушения проведения волны возбуждения, спонтанный сдвиг МПП, увеличенная длительность последней фазы реполяризации ПД, повышенный уровень $[Na^+]_i$ в ВПВ может быть обусловлен подавленной активностью NKA или сниженной экспрессией NKA.

Данное исследование поддержано НИОКР – 124013000813-3.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. Namekata, Y. Tsuneoka, and H. Tanaka, “Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium,” *Biol Pharm Bull*, vol. 36, no. 1, pp. 2–7, Jan. 2013, doi: 10.1248/BPB.B212020.
2. M. Haïssaguerre *et al.*, “Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins,” *N Engl J Med*, vol. 339, no. 10, pp. 659–666, Sep. 1998, doi: 10.1056/NEJM199809033391003.
3. S. Sugimura, T. Kurita, K. Kaitani, R. Yasuoka, and S. Miyazaki, “Ectopies from the superior vena cava after pulmonary vein isolation in patients with atrial fibrillation,” *Heart Vessels*, vol. 31, no. 9, pp. 1562–1569, Sep. 2016, doi: 10.1007/s00380-015-0767-9.
4. A. D. Ivanova and V. S. Kuzmin, “Electrophysiological characteristics of the rat azygos vein under electrical pacing and adrenergic stimulation,” *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 68, no. 5, pp. 617–628, Sep. 2018, doi: 10.1007/s12576-017-0569-1.
5. Y. Tsuneoka *et al.*, “Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium,” *J Pharmacol Sci*, vol. 133, no. 4, pp. 195–202, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.jphs.2016.12.006.
6. M. Irie, H. Hiiro, S. Hamaguchi, I. Namekata, and H. Tanaka, “Involvement of the persistent Na + current in the diastolic depolarization and automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium,” *J Pharmacol Sci*, vol. 141, no. 1, pp. 9–16, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.JPHS.2019.08.003.
7. Y. V. Egorov *et al.*, “Caveolae-Mediated Activation of Mechanosensitive Chloride Channels in Pulmonary Veins Triggers Atrial Arrhythmogenesis,” *J Am Heart Assoc*, vol. 8, no. 20, Oct. 2019, doi: 10.1161/JAHA.119.012748.

8. P. Bredeloux, C. Pasqualin, R. Bordy, V. Maupoil, and I. Findlay, “Automatic Activity Arising in Cardiac Muscle Sleeves of the Pulmonary Vein,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 1, p. 23, Dec. 2021, doi: 10.3390/biom12010023.
9. Y. Okamoto, M. Takano, T. Ohba, and K. Ono, “Arrhythmogenic coupling between the Na+–Ca2+ exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 52, no. 5, pp. 988–997, May 2012, doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.01.007.
10. M. J. Shattock *et al.*, “Na^+/Ca^{2+} exchange and Na^+/K^+-ATPase in the heart,” *J Physiol*, vol. 593, no. 6, pp. 1361–1382, Mar. 2015, doi: 10.1113/jphysiol.2014.282319.
11. H. G. Glitsch, “Electrophysiology of the Sodium-Potassium-ATPase in Cardiac Cells,” *Physiol Rev*, vol. 81, no. 4, pp. 1791–1826, Jan. 2001, doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1791.

ОБОНЯТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ВО ВКУСОВОЙ ТКАНИ: ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ «ШУМ» ИЛИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫЙ СИГНАЛ

Кабанов А.В., Коваленко Н.П., Масулис И.С.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Введение. Обонятельные рецепторы (ОР) млекопитающих представляют собой наиболее многочисленное семейство GPCR рецепторов, представленное в геноме человека 425 функционально активными генами. У грызунов (мышь, крыса) аннотировано 1130 и 1207 генов ОР соответственно [1]. Современная классификация ОР человека насчитывает 18 семейств (около 300 подсемейств), каждое из которых насчитывает до нескольких десятков генов [2]. Гены ОР формируют протяженные кластеры на хромосомах, что отражает явление их дупликации в процессе эволюции. Сами по себе белки ОР достаточно компактны (около 300 аминокислотных остатков) и содержат экстраклеточный домен (22-28 ао), семь трансмембранных доменов и цитоплазматический домен (около 20 ао). Данные о структурной организации ОР долгое время оставались недоступны в силу сложности получения препаратов белка, интегрированного в мембрану и сохраняющего нативную конфигурацию. Только в 2023 г. методом криоэлектронной микроскопии получена структура для OR51E человека [3]. Другой серьезной проблемой структурно-функциональной характеристики ОР является их деорфанизация и установление природы соответствующих лигандов. Только для 80 ОР человека имеются данные о потенциальных агонистах, полученные в основном в условиях гетерологичной экспрессии при действии растворимых соединений, что не отражает в полной мере взаимодействие с летучими одорантами [4]. Возрастающий интерес к функциям ОР связан не только с их важной ролью в поведении и адаптации животных, но и с обнаружением транскриптов генов ОР в тканях организма, не связанных с восприятием запахов: тестикулах [5], эпителии кишечника [6], макрофагах [7], некоторых видах опухолевых клеток [8]. Таким образом, формируется парадигма универсальности функций семейства ОР как целого, способных при избирательной экспрессии в тканях детектировать метаболиты различной природы и участвовать в регуляции ответа клеток на химические сигналы. Подтверждение тканеспецифичной физиологической роли ОР открывает новые возможности для управления функциональным состоянием клеток. В данной работе проведен анализ данных транскриптома вкусовой ткани мыши и обнаружена достоверная экспрессия генов ряда ОР, характерных для органа вкуса.

Методы исследования. Для анализа использовали данные секвенирования тотальной мРНК из желобоватых вкусовых сосочков мышей линии WT C57BL6/J (GSE114624) [9] и обонятельного эпителия мышей (GSE225390) [10]. Обработка результатов секвенирования включала следующие этапы: анализ качества прочтений производился при помощи программы FastQC [15]. Обрезание прочтений с низким качеством производилось при помощи программы fastp [16]. Выравнивание прочтений на референсный геном *Mus musculus* (вариант сборки mm10) производился при помощи программы HISAT2 [17]. Подсчет количества прочтений позиционированных внутри генов производился при помощи программы featureCounts [18]. Соотнесение универсальных идентификаторов генов с идентификаторами генов по классификации ENTREZ производилось при помощи программы annotateMyIDs [19]. Нормирование экспрессии генов производилось при помощи программы DESeq2 [20]. В рассмотрение принимались только те гены ОР, для которых выявлены транскрипты в более чем 50% биологических повторностей. Для сравнения полученных показателей экспрессии генов ОР были выбраны гены, демонстрирующие стабильный уровень транскриптов в серии биологических повторностей эксперимента (независимо полученные образцы РНК и запуски секвенирования).

Поиск гомологичных генов ОР человека проводили с помощью ресурса BLASTP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), в качестве запроса использовали аминокислотную последовательность.

Результаты. Анализ транскриптома клеток желобоватых вкусовых сосочков выявил 7 генов ОР, которые стабильно экспрессируются в трех физиологических состояниях мышей, использованных в эксперименте (стандартный режим приема пищи, голодание в течение 24 часов, обильный прием пищи после голодания), таблица 1.

Выявленные гены относятся ко 2, 5, 8 и 9 семействам. Для получения информации о потенциальных лигандах был проведен поиск соответствующих гомологов среди ОР человека. В силу ограниченности данных о лигандах ОР, таковые могут быть предположительно установлены только для Or9a7 (антрахинон, рутин), Or8b42 и Or8b53 (+ - карвон) . Or8b42 имеет наиболее высокий уровень транскрипции во вкусовом органе, в 2-3 раза менее выраженный по сравнению представленностью транскриптов генов кератина (Krt20) и GAPDH, обладающих стабильно высокими RPKM. Для всех генов, приведенных в табл.1 не наблюдается достоверной зависимости от характера питания, тем не менее, для Or9a7, Or2y7, Or5g29 можно отметить тенденцию к более выраженной экспрессии при нарушениях режима приема пищи (Рис. 1), что свидетельствует о возможной роли этих рецепторов в регуляции пищевого поведения и/или адаптации к условиям голодания.

Табл. 1. Транскрипты обонятельных рецепторов, выявленные во вкусовом органе мыши.

Название гена	Синонимы	Размер белка (ао)	Гомологи у человека	% идентичности	Лиганд	Источник
Olfr456	Or2r2, MOR257-7P	312	OR2F1	58	не установлен	
			OR2F1	57	не установлен	
			OR5V1	47	не установлен	
Olfr461	Or9a7, MOR120-3	313	OR9A4	73		[12]
			OR9A2	72		
			OR6M1	45	антрахинон, рутин	
olfr893	Or8c15, MOR170-11	312	8B12	62		
			8B4	63		
Olfr901	Or8b42, MOR162-8	311	8B3	68	s(+)-карвон	[11]
Olfr920	Or8b53, MOR165-6	310	OR8B8	69	не установлен	[11]
			OR11-316	69	не установлен	
			OR8B3	69	s(+)-карвон	
olfr1372	Or2y7, MOR256-54P; Olfr1372-ps1	Псевдоген	-	-	-	
olfr1414	Or6b3, MOR103-2	312	OR6B2	87	не установлен	
			OR6B3	88	не установлен	

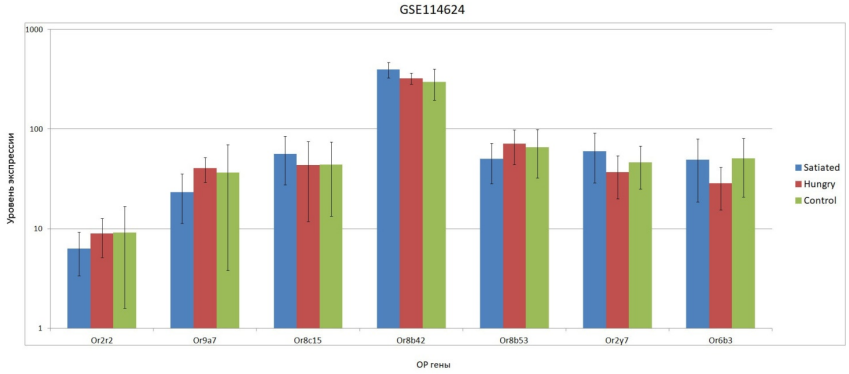


Рис. 1. Значения уровня экспрессии генов ОР во вкусовой ткани мыши. Результаты обработки первичных данных (GSE114624) нормированы по алгоритму DESeq2 . Для различных физиологических состояний животных представлены данные, усредненные по семи биологическим повторностям, с указанием среднего квадратичного отклонения (N=7).

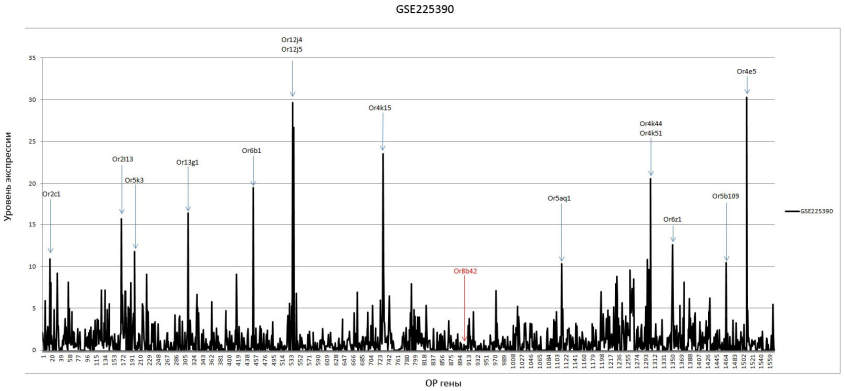


Рис. 2. Данные экспрессионного анализа генов OR для обонятельного эпителия мыши (GSE225390). Представлены средние значения по трем биологическим повторностям. Красной стрелкой отмечено положение гена Or8b42 имевшего наибольшую экспрессию в ткани желобоватых вкусовых сосочков мышей линии WT C57BL6/J (GSE114624).

Обсуждение. Эволюционное предназначение вкусового органа для восприятия стимулов химической природы *a proiri* не исключает возможности экспрессии генов OR, являющихся хеморецептирующими структурами клетки. Тем не менее, детального анализа представленности транскриптов этих генов во вкусовых клетках не предпринималось. Данные транскриптомного анализа представляют такую возможность.

Наиболее высокий уровень мРНК детектируется при анализе транскриптома вкусовой ткани для Or8b42. Можно было бы ожидать, что этот ген, так же эффективно транскрибируется и в клетках обонятельного эпителия (MOE) в силу особенностей регуляторной области и генетического окружения. Однако, проведенный параллельно анализ спектра транскриптов MOE (GSE225390) [10], показал, что данный ген, напротив, обладает низким уровнем экспрессии, так же, как и другие гены 8-го семейства (Рис. 2). При этом очевидные «лидеры» среди генов обонятельного органа (Or2i13, Or5k3, Or12j4, Or12j5, Or4k15, Or4k47, Or4e5) не выявляются в периферическом отделе вкусового анализатора. Это указывает на то, что гены OR действительно активируются тканеспецифичным образом. Это подтверждают и наши предыдущие данные по анализу транскриптов генов OR в островках Лангерганса поджелудочной железы мыши и клетках инсулиномы MIN6 [13], в которых набор транскриптов генов OR совершенно иной по сравнению с эктопически экспрессируемыми генами вкусового органа. В основе

селективной экспрессии генов ОР в той или иной ткани может лежать присутствие определенных факторов транскрипции и особенности пространственной структуры хроматина.

Обращает на себя внимание заметный уровень РНК гена Or2y7, аннотированного как псевдоген. Для этого локуса генома характерна выраженная экспрессия в различных тканях мыши по данным Mouse ENCODE Consortium [14]. Отсутствие корректной рамки считывания для синтеза рецепторного белка позволяет предполагать, что соответствующий РНК-продукт может функционировать в качестве донора регуляторных олигорибонуклеотидов или матрицы для синтеза пептидов.

Таким образом, обработка данных транскриптома позволила обнаружить неслучайную экспрессию генов ряда обонятельных рецепторов, вовлеченных, в том числе, в восприятие стимулов терпеновой природы (+-карвон). Не исключено, что ОР вносят вклад в модуляцию всего разнообразия вкусовых ощущений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова М.Ф., Колесников С.С. // Успехи физиологических наук, 2020, т.51, № 3, С. 3–15
2. Olender T. et al. //BMC Evol Biol., 2020, v. 20, № 1, P. 42.
3. Billesbølle C.B., et al. // Nature, 2023, v. 615, № 7953, P. 742-749.
4. Wang J, et al. // Front Mol Biosci., 2025, v. 11, P. 1498796.
5. Spehr M. et al. // Science, 2003, v. 299, P. 2054-2058.
6. Kotlo K. et al. //Am J Physiol Cell Physiol., 2020, v. 318, № 3, P. 502-C513
7. Vadevoo S.M.P. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A., 2021, v. 118, № 37: e2102434118
8. Otaki J.M. et al. //J. Neurobiol. 2004, v. 58, № 3, P. 315-327.
9. Crosson S.M. et al. // bioRxiv, 339911
10. Licht T. et al. //Curr Biol,, 2023,v. 33, № 22, P. 4857-4868.e6
11. Zhou C. et al. //Animals, 2023, v. 13, № 6, P.979–994
12. Choi Y., and Yoon, M. //Domest. Anim. Endocrinol., 2021, v. 74, P. 106535.
13. Коваленко Н.П. и др. //Сборник статей Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», т.1, С. 64-70.
14. Feng Yue et al. //Nature. 2014, v. 515, № 7527, P. 355-64.
15. Andrews S. // http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
16. Chen S. et al // fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. doi: 10.1101/274100
17. Kim D. et al. // Nature Methods, 2015, v. 12, № 4, P. 357–360
18. Liao, Y. et al. // Bioinformatics, 2013, v. 30, № 7, P. 923–930
19. Dunning, M. // 2017, bio.tools: annotatemyids
20. Love M. I. et al. // Genome Biology, 2014, v. 15, № 12, P.550.

ИНГИБИТОР 12/15-ЛИПОКСИГЕНАЗ БАЙКАЛЕЙН ПОДАВЛЯЕТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.[1], Крутецкая З.И.[1], Антонов В.Г.[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевой пузырь амфибий. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na^+-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса [1,2].

Важнейшую роль в редокс-регулируемых внутриклеточных сигнальных путях играют эндогенные системы глутатиона. Глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин) существует в клетке в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах и является универсальным тиолсодержащим трипептидом, обнаруженным в большинстве клеток растений, микроорганизмов и млекопитающих. На основе дисульфидсодержащих окисляющих агентов был синтезирован и успешно применён в клинической практике ряд фармакологических препаратов, объединенных в группу тиопоэтинов, характеризующихся системным цитопротекторным эффектом. Фармакологический аналог GSSG – препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) широко используется как иммуномодулятор и цитопротектор в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний, однако тонкие механизмы действия этого препарата продолжают интенсивно изучаться.

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее производные являются важными сигнальными молекулами, выступающими в качестве местных гормонов и медиаторов, играющими важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессов. Выделяют три основных пути метаболизма АК: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром Р-450-зависимый). На основе этих трех метаболических путей АК преобразуется в метаболиты,

обладающие как про-, так и противовоспалительным эффектом. В почках и других реабсорбирующих эпителиях, АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+-каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте Na^+ через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов [3,4].

Ранее, нами было показано, что ингибиторы циклооксигеназ [5] и эпоксигеназ [6] существенно снижают стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль липоксигеназного пути окисления АК в регуляторном эффекте глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали специфический ингибитор 12/15-липоксигеназ (ЛОГ) – флавоноид байкалейн (5,6,7-тригидрокси-2-фенил-(4H)-1-бензопиран-4-он). Известно, что байкалейн напрямую ингибирует 12/15-ЛОГ (значения IC_{50} составляют 0.64 и 1.6 мкМ для 12- и 15-ЛОГ, соответственно) [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 $CaCl_2$, 5 Tris HCl, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 ºC).

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 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). Глутоксим предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург. Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Число экспериментов, $n = 10$. На рис. 1 приведены результаты типичных экспериментов.

Результаты и обсуждение. Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: I_{SC} = 11.34 ± 3.2 мкА; V_{OC} = -23.54 ± 5.48 мВ; g_T = 0.36 ± 0.01 мСм.

Показано, что глутоксим, приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт Na^+. В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 200 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи было следующим: I_{SC} увеличился на 37.29 ± 11.14%, V_{OC} увеличился на 40.37 ± 14.01%, а g_T – на 2.12 ± 0.14%. Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Так, в клетках линии A431 эпидермоидной карциномы человека, GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию (лиганд-независимую активацию) рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [8, 9]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами α-субъединиц инсулинового рецептора, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, приводящий к активации Na^+-транспортирующих белков и стимуляции транспорта Na^+.

Впервые показано, что преинкубация базолатеральной поверхности кожи с байкалейном (50 мкМ), в течение 30 мин перед добавлением к той же поверхности кожи глутоксима (200 мкг/мл), существенно ослабляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ (рис. 1). В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки в этом случае было следующим: I_{SC} увеличился на 10.12 ± 3.38%, а V_{OC} – на 6.42 ± 2.01%, а g_T – на 3.06 ± 0.08%.

Известно, что транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+-транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах поляризованной эпителиальной клетки. Показано, что ключевые Na^+-транспортирующие белки, такие как ENaC, Na^+-K^+-АТФазы и Na^+/H^+-обменники, содержат многочисленные функционально значимые остатки цистеина, которые являются мишенями для действия внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [1, 2]. Добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+, что указывает на то, что влияние глутоксима на транспорт Na^+ связано, в основном, с модуляцией активности ENaC (рис. 1).

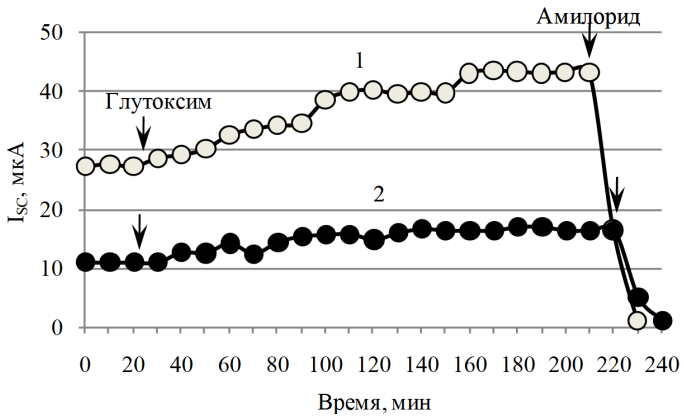


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на приложение глутоксима (200 мкг/мл). (1) – I_{SC} после добавления глутоксима со стороны базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления глутоксима со стороны базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин 50 мкМ байкалейна. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Таким образом, нами впервые показано модулирующее влияние ингибитора 12/15-ЛОГ байкалейна на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные данные свидетельствуют об участии 12/15-ЛОГ пути окисления АК в регуляторном действии глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Результаты настоящей и более ранних работ позволяют предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы, фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназу С, протеинфосфатазы, элементы актинового и тубулинового цитоскелета, а также продукты окисления АК, что приводит к стимуляции транспорта Na^+ в коже лягушки.

В то же время, известно, что 12/15-ЛОГ участвуют в патогенезе различных болезней, включая сердечно-сосудистые заболевания, рак, воспалительные, аллергические и нейродегенеративные заболевания. Ингибиторы 12/15-ЛОГ эффективно снижают выработку провоспалительных липидных медиаторов, содействуя прекращению воспаления и восстановлению тканей, обладают антиоксидантными, противоопухолевыми, противомикробными и противовирусными

свойствами [10]. В связи с этим, поиск и нацеливание селективных ингибиторов 12/15-ЛОГ является перспективной стратегией для облегчения воспаления различного генеза, лечения острого инсульта и других заболеваний мозга. В настоящее время сообщается о тестировании ряда подобных препаратов, в том числе, на основе флавоноидов растительного происхождения, таких как байкалейн и его основных метаболитов, демонстрирующих противораковые, противодиабетические, противомикробные, антивозрастные, нейропротекторные, кардиопротекторные, респираторные, гастропротекторные, гепатопротекторные и ринопротекторные эффекты в различных моделях *in vitro* и *in vivo* [11]. Эти соединения мало токсичны и легко могут взаимопревращаться в ходе метаболизма в кишечнике человека. Понимание особенностей разнообразной биологической активности байкалейна имеет решающее значение для выяснения механизмов его действия и исследования потенциального терапевтического применения препаратов на его основе.

Известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения глутоксима и ингибиторов метаболизма АК. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что совместное применение глутоксима и блокаторов 12/15-ЛОГ нежелательно, т.к. может привести к ослаблению терапевтического эффекта глутоксима. Полученные результаты способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия глутоксима и байкалейна, и могут быть полезны для применения указанных препаратов в клинической практике.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Boldyrev AA, Bulygina ER. Na/K-ATPase and oxidative stress. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1997; 834: 666–668.
2. Firsov D, Robert-Nicoud M, Gruender S, Schild L, Rossier BC. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. J. Biol. Chem. 1999; 274: 2743–2749.
3. Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV. Direct regulation of ion channels by fatty acids. Trends Neurosci. 1991; 14: 96-100.
4. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. Br. J. Pharmacol. 2008; 155: 4-16.
5. Krutetskaya ZI, Mel'nitskaya AV, Antonov VG, Nozdrachev A. Inhibitors of the cyclooxygenase oxidation pathway of arachidonic acid suppress the stimulating effect of glutoxim on Na+ transport in frog skin. Dokl. Biol. Sci. 2013; 451: 193–195.

6. Krutetskaya ZI, Melnitskaya AV, Antonov VG, Nozdrachev A. Epoxygenase inhibitors attenuate the stimulatory effect of glutoxim on Na+ transport in frog skin. Dokl. Biochem. Biophys. 2018; 480: 152–154.
7. Deschamps JD, Kenyon VA, Holman TR. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. Bioorg. Med. Chem. 2006; 14(12): 4295-4301.
8. Vasilenko KP, Burova EB, Antonov VG, Nikolskii NN. Oxidized glutathione induces activation of the epidermal growth factor receptor and MAP kinases ERK 1, 2. Tsitologiya. 2006; 48(6): 500-507.
9. Burova EB, Vasilenko KP, Antonov VG, Nikolskii NN. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim in A431 cells. Dokl. Biol. Sci. 2005; 404: 392-394.
10. Orafaie A, Mousavian M, Orafai H, Sadeghian H. An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of in vivo studies. Prostag. Oth. Lipid Mes. 2020; 148: 106411.
11. Munjal K, Goel Y, Gauttam VK, Chopra H, Singla M, Smriti, Gupta S, Sharma R. Molecular targets and therapeutic potential of baicalein: a review. Drug Target Insights. 2024; 18(1): 30-46.

АКТИВАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ ИОННОГО ТРАНСПОРТА В ПРЕДНЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД В ООЦИТАХ РЕЧНОЙ МИНОГИ: РОЛЬ ХЛОРИДНЫХ КАНАЛОВ

Никитина Е.Р., Шерстобитов А.О., Никифоров А.А.

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

Введение. Ранее мы обнаружили, что аккумуляция ионов Na^+ и K^+ в ооцитах речной миноги *Lampetra fluviailis* происходит в преднерестовый период и связана с активацией механизмов транспорта катионов (Na-насоса, NKCC-котранспорта, NHE-обмена), через плазматическую мембрану [1]. При изучении транспорта моновалентных катионов через мембрану ооцита речной миноги нами было показано, что транспорт K^+ и Na^+ за счет уабаин-чувствительного Na-K-насоса и буметанид-чувствительного механизма NKCC котранспорта зависели от энергетического метаболизма клетки [2]. В то же время, в отличие от ооцитов земноводных, на ооцитах круглоротых специальные исследования механизмов транспорта анионов не проводились. Известно, что внутриклеточный хлорид является одним из ключевых факторов в регуляции клеточного гомеостаза. Концентрация хлорида важна для таких клеточных функций как экспрессия генов, пострансляционные модификации белков, регуляция клеточного объема, пролиферация и дифференциация [3-5]. В отношении ооцитов миноги можно предположить, что частично перенос Cl^- через мембрану происходит за счет NKCC симпорта. Таким образом, целью настоящей работы было изучение механизмов транспорта Cl^- в ооцитах миноги в преднерестовый период (январь-май) в различных экспериментальных условиях - при деполяризации мембраны, изменении осмотичности среды, различной температуре инкубационной среды, в присутствии двухвалентными металлов Ca^{2+} и Mg^{2+}. Полученные результаты указывают на наличие в плазматической мембране ооцита миноги хлоридных каналов, обеспечивающих основную часть поступлениия хлорид-иона в клетку.

Методы исследования. Выделение ооцитов. Эксперименты проводили в декабре-мае в преднерестовый период жизни миног. Ооциты из яичника отделяли механически в холодный раствор Рингера, содержавшем (ммоль/л): 130 NaCl, 4 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 глюкоза, 10 Трис-HCl, pH 7,4. Фолликулярные клетки не удаляли, поскольку дополнительный захват радиоактивной метки этими клетками пренебрежимо мал ввиду относительно малого объема фолликулярного слоя (толщина 10-15 мкм) по сравнению со средним размером ооцитов

(около 1000 мкм). В то же время наличие щелевых контактов между фолликулярными клетками гарантируют достаточную проницаемость фолликулярного слоя, тем самым не лимитируя ионный транспорт через плазматическую мембрану ооцита.

Определение накопления Cl^-. Транспорт хлорида в ооциты миноги характеризовали величиной однонаправленного входного потока, измеренного с помощью радиоактивного изотопа ^{36}Cl. Ионные потоки определяли при температуре содержания животных в аквариуме – при 5°С в декабре-марте и 10°С в апреле-мае, если не указано иначе.

В каждом опыте отбирали 400-500 ооцитов от одного животного. С помощью пипетки изолированные ооциты переносили в небольшие стаканчики (20-30 клеток в пробе) и 3-4 раза промывали 1 мл среды определенного состава, не содержащей K^+. Конечный объем инкубационной среды составлял 0.5 мл. Перед добавлением изотопа стаканчики помещали в термостат МК-70 ((MLW, Germany) для выравнивания температуры, затем 10 мкл $K^{36}Cl$ исходного раствора метки вносили в инкубационную среду так, чтобы концентрация K^+ составляла 4 ммоль/л. В этом случае активность изотопа составляла 2.9 кБк^{36}Cl/мл среды.

После 15 мин инкубации с меткой отбирали аликвоту (20 мкл) среды, остаток радиоактивной среды удаляли, а ооциты смывали в воронку с миллипоровым или тефлоновым фильтром. Затем клетки быстро (в пределах 30 сек) трижды отмывали 1 мл холодного раствора Рингера под вакуумом. Отмытые клетки с фильтром помещали в небольшие пробирки с 0.5 мл дистиллированной воды, содержащей 1% Triton X-100. Для облегчения экстракции изотопа пробирки замораживали и оттаивали, после чего жидкость с клетками переносили в 10 мл диоксанового сцинтиллятора. Радиоактивность клеточных лизатов и сред измеряли на сцинтилляционном счетчике LKB 1209 (Wallac, Швеция). Достоверные отличия средних значений от аналогичных параметров в контроле ($p < 0.05$; one-way ANOVA с апостерторным тестом Тьюки)

Результаты. Кинетика накопления хлорид-ионов в ооцитах миноги. После добавления ^{36}Cl в среду инкубации наблюдается быстрое накопление метки до стационарного уровня. Близкий к линейному вход метки наблюдался в пределах первых 15 мин инкубации. Это время было использовано для расчета однонаправленного входного потока Cl^-. При 150 ммоль/л [Cl]o стационарное распределение ^{36}Cl соответствует внутриклеточной концентрации [Cl]i 10.5 ммоль/л клеток в декабре-январе и 18.6 ммоль/л клеток в апреле, а время полунакопления метки составило около 20 мин Средние однонаправленные входные потоки Cl^- были 16.2 и 28.2 нмоль Cl^- (мкл клеток х ч)$^{-1}$ или 32.4 и 43.7 Cl^- (мкл клеток х ч)$^{-1}$ с соответствующими коэффициентами проницаемости 1.5 х 10^{-6} см х с$^{-1}$

(5°C) и 3.3 x 10^{-6} см x $с^{-1}$ (10°C). Буметанид (0.1 ммоль/л) и нифлуминовая кислота (0.1 ммоль/л) не влияли на накопление Cl^- (данные не приводятся).

Концентрационная зависимость накопления ^{36}Cl. Для выявления возможного насыщения хлоридного транспорта в серии опытов NaCl в инкубационной среде изоосмотически замещали на $NaNO_3$. Как следует из Рис. 1, линейная зависимость входного потока Cl^- от концентрации хлорида в среде сохраняется во всем диапазоне используемых $[Cl^-]o$. В марте при физиологической концентрации $[Cl^-]o$ входной поток Cl^- составлял 28.3±3.0 нмоль (мкл кл x ч)$^{-1}$ (n=5).

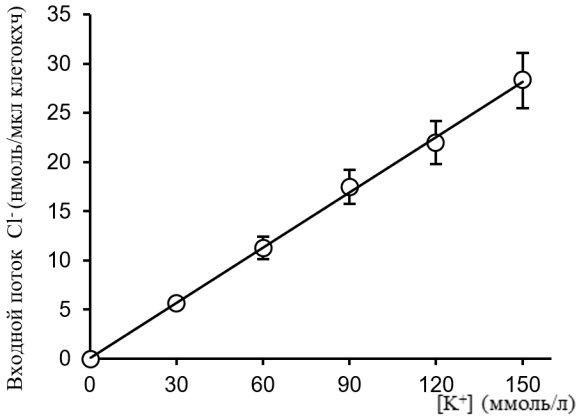


Рис. 1. Концентрационная зависимость накопления ^{36}Cl. По вертикали – входной поток Cl^- нмоль × (мкл клеток × ч)$^{-1}$. По горизонтали – концентрация хлорид-иона в инкубационной среде (ммоль/л). Среда содержала (ммоль/л): 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES pH 7.4, 4 $K^{36}Cl$. Дополнительно среда содержала в переменных концентрациях NaCl и $NaNO_3$ ($Cl^- + NO_3^- = 150$ ммоль/л). Опыты проводили в марте при температуре 5°C.

Влияние деполяризации мембраны на накопление ^{36}Cl. Чтобы оценить влияние мембранного потенциала на транспорт Cl^-, входной поток измеряли при различных $[K^+]o$ при температуре 17°C. Увеличение температуры среды инкубации обеспечивает достаточно высокую подвижность комплекса (K^+ + валиномицин) в плазматической мембране и образование K^+-зависимого мембранного потенциала. Ионы Na^+ и Cl^- были изоосмотически замещены в среде ионами Mg^{2+} и SO_4^{2-}, менее проникающими через биологические мембраны. В присутствии валиномицина деполяризация мембраны при высоких концентрациях $[K^+]o$ вызывала значительное (в 2.5 раза) ускорение входа Cl^- по сравнению со средой с низким содержанием калия. В этой серии опытов

концентрация наружного магния снижалась со 140 до 15 ммоль/л по мере увеличения $[K^+]o$ до 100 ммоль/л. Отдельно влияние $[Mg^{2+}]$ на вход Cl^- не проверяли. Однако, при тех же концентрациях $[Mg^{2+}]o$ в присутствии валиномицина и для контрольных клеток влияние деполяризации мембраны ясно выражено при $[K^+]o$ выше 50 ммоль (Рис. 2).

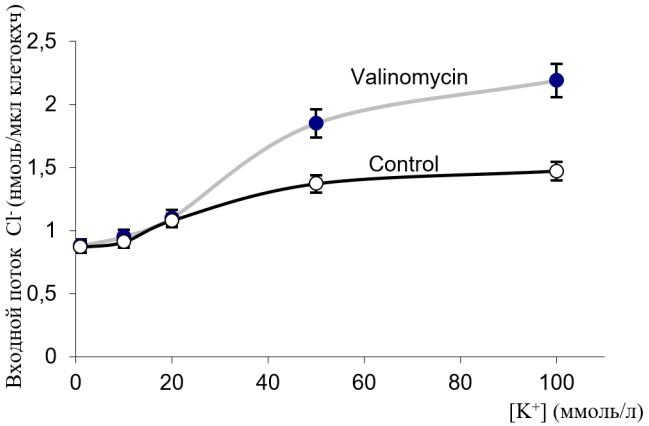


Рис. 2. Влияние деполяризации мембраны на накопление ^{36} Cl. По вертикали – входной поток Cl^- в нмоль × (мкл клеток × ч)$^{-1}$. По горизонтали – концентрация K^+ в среде (ммоль/л). Конечная среда инкубации содержала: 1 ммоль/л $K^{36}Cl$, 5 ммоль/л глюкозы и переменную концентрацию K^+, получаемую смешением двух растворов содержащих 5 ммоль/л HEPES-TRIS (pH 7.4, 17°C): (1) – 140 ммоль/л $MgSO_4$; (2) – 70 ммоль/л K_2SO_4 + 90 ммоль/л сахароза. Концентрация валиномицина 10^{-6} М/л, время преинкубации с ионофором 5 мин при комнатной температуре.

Влияние осмотичности среды на накопление $^{36}Cl^-$. В серии опытов вход хлорид-ионов в ооциты миноги изучали в средах с различной осмотичностью (Рис. 3). Для корректного сравнения потоков Cl^- все среды содержали одинаковую концентрацию $[Cl^-]o$ – 78ммоль/л. Двукратное снижение осмотичности среды вызывало значительную активацию (в 2.5-3 раза) входа Cl^-. По сравнению с контролем в гиперосмотических средах изменения входного потока Cl^- не наблюдалось.

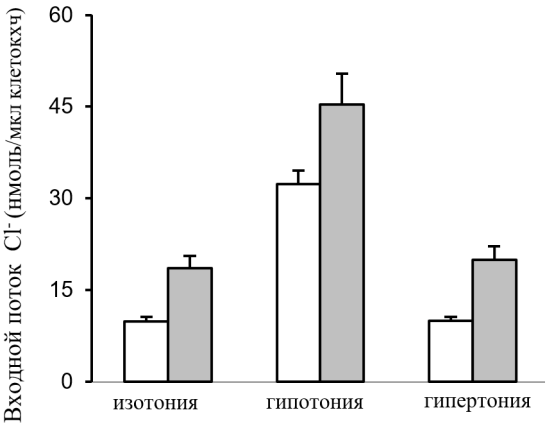


Рис. 3. Влияние осмотичности среды на накопление ^{36}Cl. По вертикали – входной поток Cl^- в нмоль × (мл клеток × ч)$^{-1}$. Гипоосмотическая среда содержит (ммоль/л): 1.0 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2$, 5 глюкоза, 5 HEPES-NaOH pH 7.4, $4K^{36}Cl$, 70 NaCl. Изоосмотическая среда содержит дополнительно 70 ммоль/л $NaNO_3$. Гиперосмотическая среда получена добавлением 200 ммоль/л сахарозы к изоосмотической среде. 1 – февраль (5°C), 2 – апрель (10°C).

Температурная зависимость транспорта Cl^-. Данные, полученные в декабре-марте и апреле, суммируют потоки Cl^- для контрольных клеток в разных вариантах опытов в стандартном растворе Рингера. В декабре-марте входной поток Cl^- в ооциты миноги составил 22.5±2.5 нмоль (мкл кл х ч)$^{-1}$ при 5°C (25 животных). В апреле повышение температуры воды в аквариуме до 10°C сопровождалось увеличением потока Cl^- до 42.9±5.3 5 нмоль (мкл кл х ч)$^{-1}$ (7 миног). В каждом из трех опытов в начале мая температуру инкубации ооцитов варьировали в пределах 5-20°C. В преднерестовом периоде средний коэффициент проницаемости для хлорида возрастал от 2.1 х 10^{-6} см/с до 6.2 х 10^{-6} см/с в мае при 5°C и от 4.7 х 10^{-6} см/с в апреле до 7.5 х 10^{-6} см/с в мае при 10°C. Наклон графика Аррениуса для температурной зависимости входа Cl^- (начало мая), показанный на Рис. 4, соответствует энергии активации 24 кДж/моль при 5-20°C.

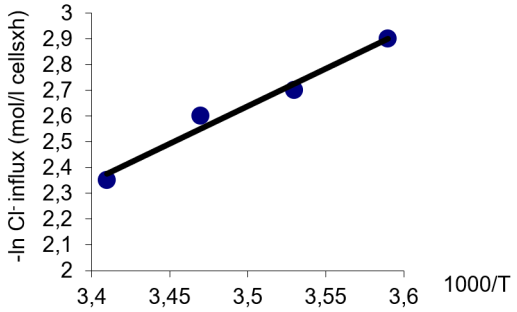


Рис. 4. График Аррениуса для транспорта Cl^-. Натуральный логарифм потока Cl^- в моль Cl × (л клеток × ч)$^{-1}$ отложен против обратной температуры. Энергия активации E_a в кДж/моль рассчитана по формуле: $Ea = \Delta \ln \mathbf{I_{Cl}} \times R/\Delta T$, где R – газовая постоянная 8.3 Дж моль$^{-1}$ К$^{-1}$.

Влияние двухвалентных катионов на накопление ^{36}Cl. Для ооцитов речной миноги увеличение наружного Mg^{2+} и Ca^{2+} от 0.15 до 10 ммоль/л, как и инкубация клеток в присутствии ионофора А23187 (5 ммоль/л Ca^{2+} в среде) для увеличения внутриклеточного содержания Ca^{2+} не влияла на транспорт Cl^-

Обсуждение результатов. Результаты настоящей работы показывают, что ооциты речной миноги обладают умеренно высокой проницаемостью для ионов хлора с P_{Cl} >10^{-6} см/с, сравнимой с проницаемостью мышечных волокон лягушки. При изучении транспорта одновалентных катионов [1-2] было установлено, что транспорт K^+ через плазматическую мембрану ооцитов речной миноги происходит за счет уабаин-чувствительного Na-K-насоса и буметанид-чувствительного механизма NKCC, причем оба механизма являются зависимыми от энергетического метаболизма клетки. В ооцитах миноги механизм активного транспорта имеет более тесную связь с аэробным путем энергообеспечения, а механизм NKCC с анаэробным. Однако, в настоящей работе транспорт Cl^-, измеренный по накоплению ^{36}Cl, оказался нечувствительным к буметаниду. Чтобы оценить активность NKCC переносчика в конце апреля - начале мая в ооцитах миног определяли накопление Rb^+ (как аналога K^+). Величину захвата Rb^+ клетками определяли с помощью спектрофотометра AA-6800 Shimadzu. При замене K^+ в стандартном растворе Рингера на 4 ммоль/л Rb^+ суммарный вход Rb^+ при 10^{o}C составлял 2.86 ± 0.21 нмоль (мкл кл х ч)$^{-1}$, т.е. маскировался на фоне высокого общего входного потока Cl^- (43-65 нмоль (мкл кл х ч)$^{-1}$). В ооцитах миноги стационарное распределение хлорида, вероятно, близко к

равновесному по Нересту при величине мембранного потенциала минус 40 мВ. Вклад NKCC не превышает 5% общего входного потока Cl^- и не изменяет распределение иона через плазматическую мембрану.

Таким образом, транспорт хлорид-ионов через плазматическую мембрану ооцита миноги имеет следующие особенности:

Вход хлорида через мембрану ооцита миноги не насыщается и линейно возрастает с увеличением концентрации [Cl-]o, по крайней мере, до физиологического значения 150 ммоль/л (Рис. 1);

Вход хлорида увеличивается при деполяризации мембраны в среде с высоким содержанием калия (Рис. 2);

Снижение осмотичности среды вызывает стимуляцию I_{Cl} (Рис. 3);

Транспорт Cl^- через мембрану имеет низкую энергию активации (Рис. 4);

Внутриклеточное содержание и входной поток хлорид-иона возрастает в преднерестовый период.

Отсутствие насыщения потока (I_{Cl}), влияния деполяризации мембраны ооцита и осмотичности среды вместе с низкой энергией активации транспорта (24 кДж/моль), в большей степени указывает на участие ионной поры (хлоридного канала), чем на механизм, опосредованный переносчиком [6,7].

Хлоридные каналы плазматических и внутриклеточных мембран играют важную роль в физиологии клетки. В частности, они участвуют в трансэпителиальном транспорте, регуляции pH внутриклеточных органелл, регуляции возбудимости и объема клетки [8].

По сравнению с ооцитами лягушки Xenopus laevis, ооциты речной миноги оказались существенно более проницаемы для ионов Cl^-. Время полунакопления Cl^- в ооцитах лягушки и миноги составляло около 180 и 20 минут соответственно. Также как в ооцитах миноги, в ооцитах лягушки наблюдалась линейная зависимость входа Cl^- от концентрации наружного Cl, стимуляция входа Cl^- при деполяризации мембраны, отсутствие эффектов ингибиторов Cl^- - HCO_3^- обмена и NKCC котранспорта. В ооцитах лягушки Xenopus laevis входной поток Cl^- ингибировался дифениламин-2-карбоксилатом (DPAC) и 9-антрацен карбоксилатом (9-AC) [9].

Как показано на Рис. 3, в ооцитах миноги Lampetra fluviatilis уменьшение осмотичности среды вызывало значительную стимуляцию транспорта хлорид-ионов. В ооцитах лягушки Xenopus laevis [10] снижение осмотичности среды на 50% вызывало появление Ca^{2+}-независимого хлоридного тока, чувствительного к блокаторам хлоридных каналов, трехвалентным лантанидам и нуклеотидам.

Известно, что в эритроцитах речной миноги наружный Mg^{2+} и Ca^{2+}, а также Cu^{2+} значительно стимулируют транспорт хлорид-иона через

плазматическую мембрану [11, 12]. В ооцитах речной миноги инкубация клеток в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} не вызывала достоверное увеличение входа Cl^-. В то же время в ооцитах Xenopus laevis наблюдали осцилляции хлоридных токов при обработке плазматической мембраны ионами Cd^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} и Cr^{2+} [13]. Авторы предположили, что при взаимодействии указанных двухвалентных катионов с поверхностью ооцита происходит увеличение цитозольной концентрации инозитолфосфатов, что приводит к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} и последующей активации Ca^{2+} -управляемых Cl^- каналов в мембране ооцита Xenopus laevis.

Полученные результаты указывают на умеренно высокую проницаемость для Cl^- плазматической мембраны за счет хлоридных каналов по ряду свойств сходных с каналами других типов клеток. Однако, биологическая роль этого иона остается неясной из-за его очень низкой внутриклеточной концентрации. В ооцитах миноги формирование ионного статуса клетки в преднерестовый период происходит за счет параллельной активации соответствующих механизмов транспорта основных неорганических ионов (NHE, Na-насос, NKCC, хлоридные каналы). Создание запаса неорганических ионов необходимо для последующего эмбрионального развития после прекращения ионного обмена при нересте миноги в пресной воде.

Работа выполнена в ИЭФБ РАН в рамках госзадания № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шерстобитов АО, Глазунов ВВ, Лапин АВ, Никифоров ВА, Никифоров АА (2011) Аккумуляция ионов натрия и калия в ооцитах речной миноги в преднерестовый период. ЖЭБФ 47(4): 278-282.
2. Шерстобитов АО, Лапин АВ, Глазунов ВВ, Беляева ЕА (2008) Зависимость транспорта ионов натрия и калия через клеточную мембрану от энергетического метаболизма в ооцитах миноги Lampetra fluviatilis. ЖЭБФ 44(3): 318-320.
3. Valdivieso, A., & Santa-Coloma, T. (2019). The chloride anion as a signalling effector. Biol Rev Camb Philos Soc. Oct: 94(5), 1839-1856.
4. Shaughnessy, C. A., & McCormick, S. D. (2019). Functional characterization and osmoregulatory role of the Na+-K+-2Cl- cotransporter in the gill of sea lamprey (Petromyzon marinus), a basal vertebrate. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 318(1), R17–R29.
5. Shaughnessy, C. A., & Breves, J. P. (2021). Molecular mechanisms of Cl- transport in fishes: new insights and their evolutionary context. Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology, 335(2), 207–216.

6. Parsegian A (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. Nature 221: 844-856.https://doi.org/10.1038/221844a0
7. Armstrong C (1975) Ionic pores, gates and gating currents. Quarterly Rewiew of Biophysics 7: 179-210.
doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb31488.x.
8. Nilius B, Droogmans G (2003) Amazing chloride channels: an overview. Acta Physiol Scand 177(2):119-147.
https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01060.x
9. Katayama Y, Widdicombe J (1991) Halide transport in Xenopus oocytes. J Physiol 443: 587-599.
https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018853
10. Ackerman M, Wickman K, Clapham D (1994) Hypertonicity activates a native chloride current in Xenopus oocytes. J of General Physiology 103: 153-179. doi: 10.1085/jgp.103.2.153
11. Gusev G, Sherstobitov A (1993) Evidence for furosemide-sensitive, Ca2+ (Mg2+)-dependent, Cl- transport in red blood cells of lamprey Lampetra fluviatilis. Comparative Biochemistry and Physiology 105A:769-775.
12. Bogdanova A, Virrki L, Gusev G, Nikinmaa M (1999) Copper effects on ion transport across lamprey erythrocyte membrane: Cl(-)/OH(-) exchange induced by cuprous ions. Toxicol Appl Pharmacol 159: 204-213.
https://doi.org/10.1006/taap.1999.8736
13. Miledy R, Parker I, Woodward R (1989) Membrane currents elicited by divalent cations in Xenopus oocytes. J of Physiology 417: 173-195.doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017796

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ $P2Y_1$ РЕЦЕПТОРА НЕОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛИФОСФАТАМИ

Рустамов Х.Р.[1], Махмудов А.Р.[1,5], Икромова Ф.Р.[1], Ветрова Е.А.[2], Винокуров А.Ю.[2], Раззокков Дж.И.[5], Абрамов А.Ю.[2,3], Баев А.Ю.[1,2]

[1]Лаборатория экспериментальной биофизики, Центр передовых технологий, Ташкент, Узбекистан
[2]Лаборатория физиологии и патологии клеток, Орловский государственный университет, Орёл, Россия
[3]Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, Queen Square, London, UK
[4]Department of Chemistry, KU Leuven, Leuven, Belgium
[5]Институт фундаментальных и прикладных исследований, Национальный исследовательский университет ТИАМЕ, Ташкент, Узбекистан

Введение. Неорганические полифосфаты (поли-Ф) – это гомополимеры, состоящие из остатков ортофосфатов, соединённых между собой фосфоангидридными связями, аналогично молекуле АТФ [1]. Поли-Ф присутствуют во всех живых организмах, включая все типы клеток млекопитающих, и их метаболизм тесно связан с системой преобразования энергии в клетке. Многие клеточные метаболиты, такие как глутамат, сукцинат, АТФ и другие, помимо выполнения своих внутриклеточных функций, способны выступать в качестве сигнальных молекул. При высвобождении во внеклеточное пространство, они могут взаимодействовать со специализированными мембранными рецепторами, обеспечивая межклеточную коммуникацию. Поли-Ф могут выделяться активированными тромбоцитами, тучными клетками и базофилами и принимать участие в процессах коагуляции, миграции, воспаления, заживления ран и дифференцировки [2-4]. В головном мозге поли-Ф могут выделяться астроцитами и участвовать в физиологической коммуникации между ними [5-7]. Было показано, что внеклеточный поли-Ф может взаимодействовать с метаботропными $P2Y_1$ рецепторами ($P2Y_1R$). Активация P2Y1R под действием поли-Ф в астроцитах запускает фосфолипазу С и индуцирует высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭР) через инозитол-1,4,5-трифосфатный путь (IP_3) [5-7]. Связывание внеклеточного поли-Ф с P2Y1R и последующее повышение концентрации внутриклеточного кальция приводит к слиянию VNUT везикул, содержащих поли-Ф с плазматической мембраной астроцитов и выбросу поли-Ф в межклеточное пространство посредством экзоцитоза [5-7]. Однако имеются данные, показывающие, что обработка клеток SaOS-2 экзогенным поли-Ф в

течение 30-60 минут вызывает выброс матриксных везикул, содержащих щелочную фосфатазу (ALP) и аденилаткиназу (AK), во внеклеточное пространство [8,9]. Авторы продемонстрировали, что обработка поли-Ф, сопровождающаяся выбросом ALP и AK, приводит к увеличению концентрации внеклеточных АТФ и АДФ по неизвестному механизму [8,9]. На основании этих данных некоторые исследовательские группы предполагают, что эффект поли-Ф на P2Y1R является опосредованным и реализуется за счёт образования АТФ и АДФ во внеклеточной среде [10]. Для прояснения этих аспектов мы изучаем механизмы активации P2Y1R под действием поли-Ф и сравниваем его эффекты с АДФ, который является природным лигандом рецептора P2Y1R.

В настоящем исследовании мы применили моделирование молекулярной динамики для изучения молекулярных механизмов активации P2Y1R в присутствии поли-Ф и АДФ. Кроме того, мы сравнили эффективность этих двух лигандов в активации P2Y1R в экспериментах на живых клетках с использованием первичных фибробластов.

Результаты.

$P2Y_1$ рецепторы представляют собой метаботропные пуринорецепторы, которые активируются преимущественно АДФ и в меньшей степени – АТФ. Недавние исследования показали, что P2Y1R также может активироваться поли-Ф – молекулами, состоящими исключительно из остатков ортофосфата и не содержащими пуриновую часть. Несмотря на то, что многочисленные исследования продемонстрировали способность внеклеточного поли-Ф передавать сигналы соседним клеткам через активацию P2Y1R, точные молекулярные механизмы этой активации до сих пор остаются неясными.

В настоящем исследовании с использованием метода симуляции молекулярной динамики мы показали, что связывание поли-Ф с неактивным P2Y1R индуцирует конформационные изменения, способствующие переходу рецептора в активное состояние. Связывание поли-Ф-14 (поли-Ф, состоящий из 14 остатков ортофосфорной кислоты) с P2Y1R приводит к разрыву связи между аминокислотными остатками D204 и R310, увеличивает площадь, доступную для растворителя (SASA) в связывающем кармане рецептора и вызывает приток воды в его внутреннюю область. Эти процессы вызывают перестройку внутриклеточных трансмембранных спиралей, аналогичную той, которая наблюдается при активации рецептора АДФ.

В соответствии с результатами *in silico*, добавка поли-Ф и АДФ, в одинаковых концентрациях, в экспериментах на фибробластах кожи вызывало кальциевый сигнал схожей формы и амплитуды. Таким образом, наши данные демонстрируют, что поли-Ф могут связываться с P2Y1R и активировать его по молекулярному механизму, аналогичному механизму

действия его природного лиганда – АДФ. Мы также выдвигаем гипотезу, что ключевым событием в активации P2Y1R является взаимодействие пирофосфатной части АДФ или полифосфата с определёнными аминокислотными остатками рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baev AY, Abramov AY: Inorganic Polyphosphate and F_0F_1-ATP Synthase of Mammalian Mitochondria. *Prog Mol Subcell Biol* 2022, 61:1-13.
2. Morrissey JH, Choi SH, Smith SA: Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* 2012, 119:5972-5979.
3. Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renne T: Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009, 139:1143-1156.
4. Suess PM, Smith SA, Morrissey JH: Platelet polyphosphate induces fibroblast chemotaxis and myofibroblast differentiation. *J Thromb Haemost* 2020, 18:3043-3052.
5. Holmstrom KM, Marina N, Baev AY, Wood NW, Gourine AV, Abramov AY: Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain. *Nat Commun* 2013, 4:1362.
6. Angelova PR, Baev AY, Berezhnov AV, Abramov AY: Role of inorganic polyphosphate in mammalian cells: from signal transduction and mitochondrial metabolism to cell death. *Biochem Soc Trans* 2016, 44:40-45.
7. Angelova PR, Iversen KZ, Teschemacher AG, Kasparov S, Gourine AV, Abramov AY: Signal transduction in astrocytes: Localization and release of inorganic polyphosphate. *Glia* 2018, 66:2126-2136.
8. Muller WE, Tolba E, Feng Q, Schroder HC, Markl JS, Kokkinopoulou M, Wang X: Amorphous Ca(2)(+) polyphosphate nanoparticles regulate the ATP level in bone-like SaOS-2 cells. *J Cell Sci* 2015, 128:2202-2207.
9. Muller WEG, Wang S, Neufurth M, Kokkinopoulou M, Feng Q, Schroder HC, Wang X: Polyphosphate as a donor of high-energy phosphate for the synthesis of ADP and ATP. *J Cell Sci* 2017, 130:2747-2756.
10. Yegutkin GG: Adenosine metabolism in the vascular system. *Biochem Pharmacol* 2021, 187:114373.
11. Yuan S, Filipek S, Palczewski K, Vogel H: Activation of G-protein-coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway. *Nat Commun* 2014, 5:4733.
12. Yuan S, Chan HC, Vogel H, Filipek S, Stevens RC, Palczewski K: The Molecular Mechanism of P2Y1 Receptor Activation. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016, 55:10331-10335.

DE NOVO ДИЗАЙН НОВЫХ БЕЛКОВ МОДУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Рустамов Х.Р.[1], Небесная К.С.[1], Майоров С.А.[3], Гайдин С.Г.[3], Косенков А.М.[3], Баев А.Ю.[1,2]

[1]Центр Передовых Технологий, Ташкент, Узбекистан
[2]Национальный Университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан
[3]Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия

Введение. В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке мощных инструментов машинного обучения для дизайна *de novo* белковых связывающих молекул. Однако создание белковых молекул, которые могут влиять на физиологию клеток, остается сложной задачей. В данной работе мы разработали генеративную нейронную сеть, интегрированную в протокол AF2seq, для создания новых белков, связывающихся с клеточными рецепторами. При помощи данного алгоритма мы создали пептиды модуляторы ионотропных глутаматных рецепторов AMPA и NMDA, а также белки, связывающиеся с рецептором EGF. Эти рецепторы играют ключевую роль в ряде нейродегенеративных и онкологических заболеваний, и их специфическая модуляция открывает большие перспективы для разработки новых терапевтических средств [1,2].

Результаты. Для генерации новых белков, связывающихся с рецептором-мишенью, мы разработали алгоритм AF2-генератор [3]. Наш алгоритм включает генеративную модель, которая принимает шумовой вектор z размерностью 1×100 и преобразует его в закодированную последовательность пептидов. Затем аминокислотные последовательности из генератора в комбинации с маскированным шаблоном целевого белка (NMDAR, AMPAR или EGFR) использовались для предсказания комплекса пептид-рецептор с помощью AF2 [4]. Основной целью было создание пептидов, связывающихся с активными участками целевого белка. Для обновления параметров генератора мы рассчитывали функцию потерь, основанную на минимальном расстоянии между структурой сгенерированного пептида и выделенными ключевыми аминокислотными остатками рецептора, а также метрикой plDDT из AF2.

Используя описанный алгоритм, мы сгенерировали 20 пептидов-лигандов для AMPAR (лиганд-связывающий домен) и NMDAR (N-концевой домен) после обучения модели в течение 50 эпох. Затем мы

отобрали пептиды, имеющие минимальное расстояние до целевого интерфейса и соответствующие критериям plDDT комплекса> 80 и pTM пептида> 0.8.

Лучшие пептиды для AMPAR (AMPAP) и NMDAR (NMDAP) были синтезированы (твердофазным синтезом) и использованы для in vitro экспериментов. AMPAR и NMDAR являются ионными каналами, активируемыми лигандом, и их активация агонистами приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{in}$) в нейрональных клетках. Для оценки действия разработанных пептидов на рецепторы мы измеряли $[Ca^{2+}]_{in}$ в со-культурах нейронов и астроцитов, выделенных из коры неонатальных крыс, с использованием флуоресцентной микроскопии. Наши эксперименты показали, что разработанные пептиды увеличивают $[Ca^{2+}]_{in}$ в нейрональных клетках в концентрационной зависимости. Эффект AMPAP значительно уменьшался в присутствии антагониста AMPAR – CNQX и в среде без Ca^{2+}, но не зависел от блокатора канала NMDAR – MK-801. Аналогичные результаты наблюдались с NMDAP – его эффект зависел от ингибитора NMDAR MK-801 и среды без Ca^{2+}, но не зависел от антагониста AMPAR. Наши результаты показывают высокую селективность разработанных пептидов к таргетным типам ионотропных глутаматных рецепторов.

После этого мы решили расширить применимость нашего алгоритма на генерацию более длинных белков. Для этого были созданы 20 белков длиной 100 аминокислот, специфичных к рецептору EGF. Все полученные последовательности были оптимизированы с помощью модели ProteinMPNN с целью повышения экспрессии и растворимости [5].

Шесть лучших анти-EGF белков были синтезированы в бесклеточной системе экспрессии. Их аффинность к целевому рецептору оценивалась методом интерферометрии биомолекулярного слоя (BLI). Экспрессированные лиганды иммобилизовали на поверхности сенсора, через который пропускали антиген (EGFR) в различных концентрациях (10 нМ, 31.6 нМ, 100 нМ, 316.2 нМ). Все эксперименты проводились в буфере PBS-T с 0.02% BSA при температуре 25 °C.

Наши результаты показали, что все исследованные белки демонстрировали высокую степень экспрессии (>10 мг/мл). Один из шести белков связывался с EGFR с константой диссоциации (K_d), равной 4.7 мкМ.

В данной работе мы разработали новую модель нейронной сети для *de novo* дизайна пептидов и белков, связывающихся с клеточными рецепторами. Мы использовали свой алгоритм для генерации новых селективных пептидов модуляторов ионотропных глутаматных рецепторов AMPA и NMDA, а также белков, связывающихся с EGFR с высокой аффинностью. Селективность и аффинность разработанных белков была подтверждена как *in silico*, так и *in vitro* экспериментами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goverde C.A., Wolf B., Khakzad H., Rosset S., Correia B.E. (2023) De novo protein design by inversion of the AlphaFold structure prediction network. *Protein Sci,* 32(6): e4653. DOI: 10.1002/pro.4653
2. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R.J.P.r. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. 62(3): 405-496.
3. Rustamov K., Nebesnaya K., Baev A.Y. (Year). *COMPUTATIONAL DESIGN OF NOVEL AMPAR AND NMDAR PEPTIDE MODULATORS*. Paper presented at the ICLR 2024 Workshop on Generative and Experimental Perspectives for Biomolecular Design.
4. Evans R., O'Neill M., Pritzel A., Antropova N., Senior A., Green T., Žídek A., Bates R., Blackwell S., Yim J., Ronneberger O., Bodenstein S., Zielinski M., Bridgland A., Potapenko A., Cowie A., Tunyasuvunakool K., Jain R., Clancy E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D. (2022) Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*.
5. Dauparas J., Anishchenko I., Bennett N., Bai H., Ragotte R.J., Milles L.F., Wicky B.I.M., Courbet A., de Haas R.J., Bethel N., Leung P.J.Y., Huddy T.F., Pellock S., Tischer D., Chan F., Koepnick B., Nguyen H., Kang A., Sankaran B., Bera A.K., King N.P., Baker D. (2022) Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science,* 378(6615): 49-56. DOI: 10.1126/science.add2187

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГОРМОНА РОСТА В ГРАНУЛЕЗНОМ СЛОЕ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ ЗАВИСИТ ОТ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭНДОКРИННЫХ ФАКТОРОВ

Смекалова А.А., Костюнина О.В., Лебедева И.Ю.

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

Введение. Гормон роста (ГР) является плейотропным гормоном и оказывает у позвоночных животных множество значимых эффектов, включая модуляцию продолжительности жизни [1]. Наряду с ростостимулирующим и метаболическим действием на организм, важную роль также играет участие этого гормона в регуляции функционирования яичников, затрагивающее его различные аспекты, в том числе овариальное старение [2]. Установлено, что у млекопитающих ГР влияет на развитие и овуляцию фолликулов, их устойчивость к атрезии и чувствительность к гонадотропным гормонам, а также на качество, созревание и митохондриальную активность ооцитов [2,3].

Регуляторное действие ГР на клетки-мишени достигается после его связывания с рецепторами, расположенными на плазматической мембране, и активации различных сигнальных путей, ассоциированных с киназами JAK2, Src, MAPK, PKC и PI3K/Akt [4,5]. Присутствие рецепторов ГР (ГР-Р) и их мРНК выявлено в клетках яичника не только у млекопитающих, но и у птиц [6,7]. Кроме того, у домашней курицы показано in vivo и in vitro влияние этого гормона на рост, развитие и секреторную активность овариальных фолликулов и на функциональное состояние фолликулярных клеток [8]. При этом ГР не только поступает в яичник из кровеносной системы, но и синтезируется локально, что свидетельствует о его паракринном/аутокринном действии.

Экспрессия рецепторов ГР зависит от множества факторов, таких как стадия онтогенеза, тип ткани, степень дифференцировки клеток, воздействие различных гомонов и др. [9-11]. К наиболее известным эндокринным модуляторам ГР-Р относят инсулин, тиреоидные гормоны, половые стероидные гормоны и сам ГР [10,12,13]. При этом гормональное влияние на экспрессию рецепторов ГР может быть видо- и тканеспецифическим [10,13,14]. В крови домашних кур в конце каждого овуляторного цикла происходит кратковременное повышение концентрации лютеинизирующего гормона (ЛГ) и половых стероидных гормонов, которое может влиять на концентрацию ГР-Р в гранулезном слое иерархических фолликулов [6]. Однако остается неясным,

модулирует ли гормональная преовуляторная волна экспрессию этих рецепторов на уровне транскрипции или на посттранскрипционном уровне. Также до сих пор не исследовано, зависит ли такая модуляция от процесса репродуктивного старения.

В этой связи нами проведено сравнительное исследование экспрессии гена рецептора ГР (*GHR*) в клетках гранулезы преовуляторных фолликулов в различные стадии овуляторного цикла у кур разного возраста и репродуктивного статуса.

Методы исследования. Для экспериментов было отобрано 3 группы домашних кур по 12 голов в каждой: МДК – молодые птицы в возрасте 25-30 недель, несущие длинные кладки яиц (>7 дней); ПДК - постаревшие птицы в возрасте 65-130 недель с длинной яйцекладкой и ПКК – постаревшие птицы в том же возрасте, но с короткой кладкой яиц (от 3 до 6 дней). Все куры были использованы в первый продуктивный период, т.е. до наступления линьки. Время снесения яиц контролировали ежедневно с помощью видеосистемы, начиная с первого дня кладки, что позволяло рассчитать время овуляции и средний интервал между овуляциями.

Сбор преовуляторных фолликулов проводили через 7.5 ч (середина овуляторного цикла; n=6) и 21 ч (время преовуляторной волны; n=6) после предшествующей овуляции. Для исследований использовали два самых больших желтых фолликула F1 и F2, где F1 – фолликул, предназначенный для овуляции в текущем цикле. Слой клеток гранулезы выделяли согласно методу A.B. Gilbert и соавт. [15], отмывали от желтка фосфатным буферным раствором, помещали в Tri reagent («Molecular Research Center, Inc.», США) и хранили при –80°C.

Для выделения тотальной РНК применяли коммерческий набор РНК-ЭКСТРАН (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией компании-производителя. Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью набора реактивов для обратной транскрипции, содержащего ревертазу M-MuLV-RH и гексапраймеры (ООО «Биолабмикс», Россия). Для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени методом TaqMan использовали флуоресцентно-меченые зонды и коммерческий набор БиоМастер HS-qPCR (2x) (ООО «Биолабмикс», Россия). В реакционную смесь общим объемом 20 мкл вносили 2 мкл полученного раствора кДНК, по 0.2 мкл праймеров для двух генов домашнего хозяйства (*ACTB* и *GAPDH*) и 0.1 мкл соответствующих зондов, а также 0.4 мкл праймеров для гена *GHR* и 0.2 мкл зонда. Исходная концентрация всех праймеров и зондов, синтезированных АО «ГенТерра» (Россия), составляла 10 мкМ; их нуклеотидная последовательность приведена в таблице 1. Полимеразную цепную реакцию выполняли с использованием амплификатора Quant Studio 5 («Applied Biosystems»,

США) по следующему протоколу: первичная денатурация (95°C, 5 минут), далее 45 циклов: денатурация (95°C, 20 секунд), отжиг праймеров (60°C, 45 секунд), элонгация 72°C, 20 секунд. Все реакции были выполнены в двух повторностях. Определение порогового числа циклов (Ct) проводили с помощью программного обеспечения Analysis Software V1.5.1 («Applied Biosystems», США). Полученные данные анализировали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [16] с помощью программы Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США), для нормирования использовали среднее геометрическое по двум референсным генам – *ACTB* и *GAPDH* [17]. Для оценки изменения экспрессии гена *GHR* в качестве референсного образца служили клетки гранулезы из фолликула F1 в середине овуляторного цикла у молодых кур.

Табл. 1. Последовательность праймеров для целевого и референсных генов

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров (5' → 3')	Источник
ACTB	F: TGATATTGCTGCGCTCGTTG R: ATACCTCTTTTGCTCTGGGCTT Pr: FAM-CCTTGCACATACCGGAGCCATTGTC-BHQ1	[17]
GAPDH	F: TTCTTCCACCTTTGATGCGG R: TGTGCTTGGCTCACTCCTTG Pr: R6G-TGGTCATTCAGTGCAATGCCAGCAC-BHQ1	[17]
GHR	F: CAGACAGCACTGACTCAGCTA R: TGGTAAGGCTTTCTGTGGTGA Pr: Cy5-AACTTCACCATGGACAATGCC-BHQ2	[18]

Для оценки экспрессии гена *GHR* в гранулезном слое преовуляторных фолликулов в каждой экспериментальной группе для каждой временной точки было использовано 6 птиц. Полученные данные были тестированы на соответствие нормальному распределению и равенство дисперсий при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.), после чего обработаны методом дисперсионного анализа (ANOVA) или ANOVA с повторными измерениями. В последнем случае категория фолликулов служила фактором повторных измерений. Результаты выражали как средние значения ± стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ экспрессии гена *GHR* в гранулезном слое показал отсутствие существенных различий между фолликулами F1 и F2 независимо от возраста и репродуктивного статуса домашних кур (рис. 1). В то же время у птиц в возрасте 41-47 недель с высокой яйценоскостью было обнаружено повышение числа связывающих участков для ГР в клетках гранулезы в процессе созревания преовуляторных фолликулов от стадии F2 до стадии F1 [6].

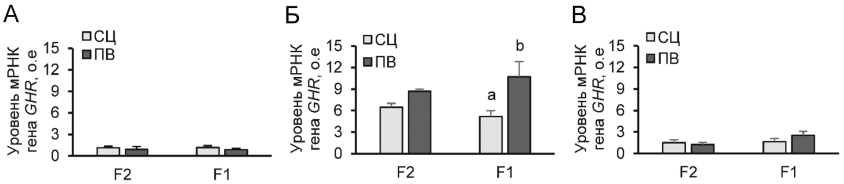


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *GHR* в гранулезном слое преовуляторных фолликулов F1 и F2 в середине овуляторного цикла (СЦ) и во время преовуляторной волны гормонов (ПВ) у кур в группах МДК (А), ПДК (Б) и ПКК (В). Достоверные различия: ^{a,b} – $p < 0.05$.

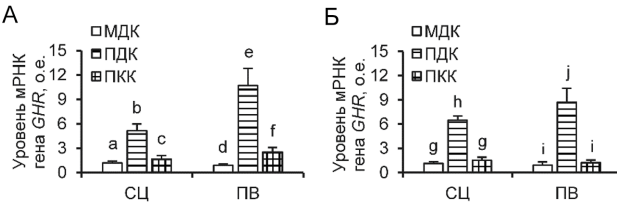


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *GHR* в гранулезном слое преовуляторных фолликулов F1 (А) и F2 (Б) в середине овуляторного цикла (СЦ) и во время преовуляторной волны гормонов (ПВ) у кур в группах МДК, ПДК и ПКК. Достоверные различия: ^{a,b} – $p < 0.001$; ^{b,c} – $p < 0.01$; ^{d,e} – $p < 0.001$; ^{e,f} – $p < 0.01$; ^{g,h} – $p < 0.001$; ^{i,j} – $p < 0.001$.

Следовательно, такое повышение могло происходить только на пост-транскрипционном уровне. Кроме того, в упомянутой выше работе у высокопродуктивных кур-несушек было обнаружено возрастание концентрации рецепторов ГР в гранулезном слое фолликулов после преовуляторного пика ЛГ и половых стероидных гормонов [6]. В нашем исследовании значимое увеличение содержания транскриптов гена *GHR* в клетках гранулезы наблюдалось только в случае предназначенного к овуляции фолликула F1 у постаревших кур с длинными кладками яиц (рис. 1Б). Эти данные указывают на то, что способность повышать экспрессию рецепторов ГР в ответ на преовуляторную волну репродуктивных гормонов реализуется, по крайней мере частично, на транскрипционном уровне. Такая способность формируется постепенно к 40 неделям жизни [6] и поддерживается у постаревших кур, сохраняющих высокую яйценоскость, но утрачивается у птиц с признаками репродуктивного старения.

Полученные данные также показывают, что содержание мРНК гена *GHR* в клетках гранулезы выше у кур в группе ПДК, чем в группах МДК и ПКК, независимо от степени зрелости преовуляторного фолликула или стадии овуляторного цикла (рис. 2). Это позволяет предположить, что повышенная способность к экспрессии гена *GHR* в гранулезном слое больших желтых фолликулов может иметь компенсаторное значение для сохранения продолжительности циклов яйцекладки с возрастом.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что экспрессия гена *GHR* в клетках гранулезы преовуляторных фолликулов домашней курицы зависит от возраста, преовуляторной волны гормонов, а также процессов, связанных с репродуктивным старением.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема FGGN-2024-0014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Caputo M, Pigni S, Agosti E et al. Regulation of GH and GH signaling by nutrients. *Cells.* 2021;10(6):1376.
2. Han L, Tian H, Guo X, Zhang L. Regulation of ovarian function by growth hormone: potential intervention of ovarian aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;13:1072313.
3. Chang CW, Sung YW, Hsueh YW. Growth hormone in fertility and infertility: mechanisms of action and clinical applications. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1040503.
4. Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:35.
5. Frank SJ. Classical and novel GH receptor signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518:110999.
6. Lebedeva IY, Lebedev VA, Grossmann R et al. Characterization of growth hormone binding sites in granulosa and theca layers at different stages of follicular maturation and ovulatory cycle in the domestic hen. *Biol Reprod.* 2004;71(4):1174-1181.
7. Hrabia A, Paczoska-Eliasiewicz HE, Berghman LR et al. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell Tissue Res.* 2008;332(2):317-328.
8. Смекалова АА, Лебедева ИЮ. Роль соматотропного гормона в эндокринном и локальном контроле репродуктивной функции у домашней курицы (*Gallus domesticus* L.) (обзор). *Сельскохозяйственная биология.* 2024;59(6):1076-1090.
9. Talamantes F, Ortiz R. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor. *J Endocrinol.* 2002;175(1):55-59.
10. Birzniece V, Sata A, Ho KK. Growth hormone receptor modulators. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10(2):145-156.
11. Chen H, Cui Y, Yu S. Expression and localisation of FSHR, GHR and LHR in different tissues and reproductive organs of female yaks. *Folia Morphol (Warsz).* 2018;77(2):301-309.

12. Mense K, Meyerholz M, Gil Araujo M et al. The somatotropic axis during the physiological estrus cycle in dairy heifers - effect on hepatic expression of GHR and SOCS2. *J Dairy Sci.* 2015;98(4):2409-2418.
13. Silva PRB, Weber WJ, Crooker BA et al. Hepatic mRNA expression for genes related to somatotropic axis, glucose and lipid metabolisms, and inflammatory response of periparturient dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci.* 2017;100(5):3983-3999.
14. Mao JN, Cogburn LA, Burnside J. Growth hormone down-regulates growth hormone receptor mRNA in chickens but developmental increases in growth hormone receptor mRNA occur independently of growth hormone action. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;129(2):135-143.
15. Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM, Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (Gallus domesticus). *J Reprod Fertil.* 1977;50(1):179-181.
16. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3):71-85.
17. Qin N, Shan X, Sun X et al. Evaluation and validation of the six housekeeping genes for normalizing mRNA expression in the ovarian follicles and several tissues in chicken. *Braz J Poultry Sci.* 2020; 22(3):1-12.
18. Hrabia A, Grzegorzewska AK, Sechman A. Expression and localization of growth hormone receptor in the oviduct of the laying hen (Gallus domesticus). *Folia Biol (Krakow).* 2013;61(3-4):271-276.

ИЗВЕСТНЫЕ И НЕИЗВЕСТНЫЕ ХРОМОФОРЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ

Терпугов Е.Л., Дегтярева О.В.

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

Свет управляет биологией, поставляя энергию и информацию, необходимые для жизнедеятельности организмов посредством фоторецепторов. Последними являются ретинальные белки, которые используют световую энергию для широкого спектра различных функций, таких как транспорт ионов, фотосенсорика и активность каналов [1,2]. Эти мембранные белки в последнее время были выделены в большом количестве из различных микроорганизмов (бактерии, археи и эукариоты Archaea, Eubacteria и Eukarya) [3]. Бактериородопсин (БР) из *H. salinarum* является типичным представителем микробных родопсинов и гомологом зрительного родопсина со схожей структурой, которая включает белок опсин, организованный в семь трансмембранных α-спиралей, и хромоф, небольшая молекула ретиналя, присоединенная к белку посредством образования Шиффовой связи с остатком лизина в 7-ой спирали [4]. Поглощение света вызывает в БР изменения конформации белка, индуцированные первичной изомериризацией хромофорного ретиналя вокруг критической двойной связи C13=C14 (переход от *транс* к *цис*), что приводит к переносу одного протона из цитоплазмы на внеклеточную сторону мембраны [5]. Изомеризация двойной связи ретиналя в БР является одним из наиболее изученных процессов в фотобиологии. Наблюдаемые спектральные изменения показывают, что фотоизомеризация происходит с более высокой по сравнению с раствором скоростью и высокой эффективностью (квантовый выход ~ 0.64), что указывает на катализирующую роль белкового окружения. Механизмы, задействованные в этом процессе, сложны и не полностью изучены. В целом, для большинства фотосенсорных белков остается еще много вопросов, одним их которых является вопрос о том, как свет взаимодействует с белком опсином. В традиционной модели существенной чертой фотоцикла является начальная *транс→цис* изомеризация ретиналя [5], которая инициирует цепь структурных превращений белка, подстраивающегося под измененную геометрию ретиналя. В альтернативной гипотезе белок активируется посредством

механизма, который не включает *транс-цис*-изомеризацию, а первичным светоиндуцированным событием является внезапная поляризация среды вокруг ретиналя [6,7]. Активации белка скорее приписывается делокализации заряда в первично сгенерированном возбужденном состоянии хромофора, как результат увеличения дипольного момента ретиналя на целых 10-30 D [8,9], который и запускает фотоцикл. Это подтверждают данные, показывающие, что белок испытывает конформационные изменения даже в искусственных пигментах, в которых изомеризация двойной связи C13=C14 предотвращается жесткими кольцевыми структурами [10]. При очевидной ключевой роли возбужденных состояний хромофора БР в первичной фотореакции, относительная роль процесса изомеризации и макроскопической поляризации является предметом интенсивных споров, поскольку не ясно сопрягаются ли и каким-либо образом конформационные изменения, вызванные поляризацией, с тем, которые вызваны *транс-13-цис*-изомеризацией [11]?

В настоящей работе частично мы подходим к этим вопросам проводя спектральные измерения ИК-эмиссии и собственной флуоресценции фотовозбужденных молекул, поскольку эмиссионные измерения являются наиболее прямым способом получения информации о возбужденных состояниях и процессах миграции энергии электронного возбуждения. Помимо нативного БР, мы использовали глицин, L-лизин и L-аргинин, неароматические аминокислоты (АК), мономеры которых не поглощают видимый свет, но по мере увеличения концентрации испускают флуоресценцию в ближней УФ- и видимой области [12]. Хотя природа такой спектральной активности не ясна, широко распространенным представлением является то, что этому явлению способствуют межмолекулярные взаимодействия, приводящие к образованию агрегатов и сети водородных связей. В данной работе модельные соединения мы использовали с целью демонстрации того, что пентамерная структура в активном центре БР, которая состоит из трех молекул воды (Wat401, Wat402 и Wat406), связанных водородными связями с Шиффовым основанием (ШО) и карбоксильными группами АК Asp85, Asp 212 и Arg 82 [4], может быть напрямую активирована светом.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показаны спектры ИК-эмиссии БР в диапазоне волновых чисел 2000 $см^{-1}$ и 1700 $см^{-1}$ при изменении мощности действующего света ($340< \lambda<730$ нм) от 42 до 660 мВт. Хотя в этом ИК-диапазоне белки не поглощают, довольно слабые изменения в ИК-поглощении в виде чрезвычайно широких континуумов были недавно обнаружены при фотовозбуждении БР [13]. Такие адсорбционные континуумные полосы, простирающиеся в диапазоне высоких ИК-частот характерны для протонированных водных кластеров.

Важной спектральной особенностью спектров ИК-эмиссии, представленных на рис. 1, является широкий набор одиночных полос в области 1700-2000 $см^{-1}$, частоты которых попадали в область 1700–1800 $см^{-1}$, где локализованы валентные C=O колебания неионизованной COOH группы в свободном (1780-1740 $см^{-1)}$ и водородосвязанном состоянии (1735-1710 $см^{-1}$) [14], и в область выше 1900 $см^{-1}$, соотнесенную с протонированными водородно-связанными сетями, участвующими в фотоцикле БР [13,15]. Тщательное изучение спектров показывает изменение интенсивности и профиля полос в зависимости от мощности. Варьирование мощности от 42 мВт до 660 мВт приводило к сдвигу максимума, изменению интенсивности, формы и полуширины полос. При монотонном росте интенсивности спектра (данные не приведены) рост интенсивности полос был немонотонным. Изменение спектральных характеристик дает представление о флуктуациях внутри связанных структур в активном центре БР, которые происходят в возбужденном состоянии.

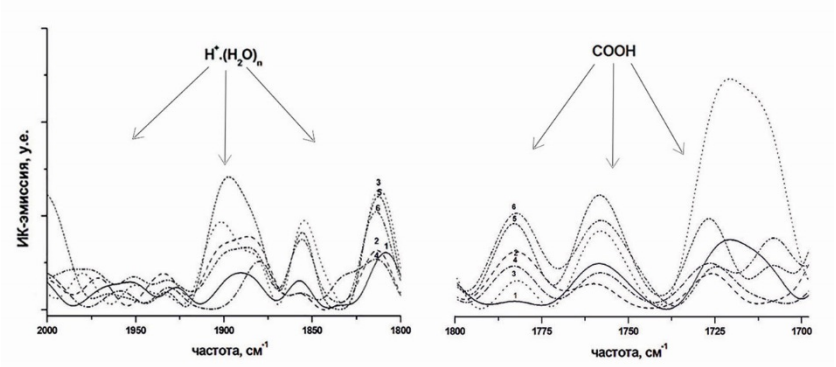


Рис. 1. Изменения в области 1800-2000 $см^{-1}$ ИК-Фурье спектров эмиссии БР как функции мощности возбуждающего света (340< λ<730 нм): (*кривые)*: *1-2-3-4-5-6* соответствуют мощности 42, 72, 93, 146, 170, 660 мВт.

В данной работе спектральный отклик от растворов глицина, L-лизина HCl и L-аргинина HCl при концентрации 1M (pH~6.8) регистрировали в ИК-диапазоне 2500-400 $см^{-1}$. В ИК-эмиссии были обнаружены новые по сравнению с колебательным спектром ИК-поглощения полосы, обусловленные присутствием водородосвязанных структур и димеров. В частности, в спектре Lys наблюдались относительно сильные полосы возле1721, 1760 и 1780 $см^{-1}$, обусловленные колебаниями COOH в димере или протонированном водном кластере, присутствие последнего было обнаружено ранее. Варьирование мощности

действующего света в условиях, аналогичных экспериментам с БР вызывало подобные изменения в профиле и интенсивности спектральных полос в высокочастотной области выше 1700 $см^{-1}$, что могло быть результатом внутренних. возмущений структуры водородных связей в кластере, оказываемых влиянием электрической составляющей на подвижность и пространственную ориентацию заряженных групп.

Также наши исследования показали, что концентрированные растворы неароматических АК являются фотоактивными, демонстрируя в отсутствие коньюгированных связей способность поглощать видимый свет в возбужденном состоянии и излучать флуоресценцию, зависимую от возбуждения, когда коротковолновая полоса излучения возникает из коротковолнового спектра возбуждения, а длинноволновая полоса излучения возникает из длинноволнового спектра возбуждения. Данное наблюдение согласуется с данными литературы [13]. В данной работе мы обнаружили еще одно интересное свойство этих АК. Оказалось, что при комнатной температуре в водных растворах помимо мгновенной наблюдается более слабая по интенсивности замедленная флуоресценция, спектр которой по форме и положению максимума совпадал со спектром мгновенной флуоресценции, но регистрировался после выключения возбуждающего света с задержкой по времени в 3 мсек. Заметим, что подобное редко наблюдается даже для органических красителей.

В красителях первые возбужденные электронные состояния соответствуют синглетному S_1 и триплетному T_1. Флуоресценция наблюдается при излучательном переходе из S_1 в основное $S_1 \rightarrow S_0$. Радиационный переход из $T_1 \rightarrow S_0$ запрещен по спину, поэтому T_1 состояние оказывается долгоживущим и проявляется как фосфоресценция, когда электрон в возбужденном T_1*излучательно релаксирует в основное состояние, испуская фотон света меньшей энергии. Спектр фосфоресценции смещен в сторону более длинных волн. Распад $T_1^* \rightarrow S_0$ возможен также через процесс реконверсии (обратной интеркомбинационной конверсии), когда триплетное возбужденное состояние переходит в S_1 состояние без излучения. В этом случае тепловая энергия используется для преобразования электрона из возбужденного триплетного в возбужденное синглетное состояние ($T_1^* \rightarrow S_1$), где он затем излучается в событии $S_1 \rightarrow S_0$ флуоресценции. Этот процесс называется замедленной флуоресценцией 1-ого типа или термоактивированной замедленной флуоресценцией и характеризуется неизменным спектром флуоресценции.

Заключение. В совокупности проведенные исследования и описанные фоточувствительные свойства модельных соединений устанавливают вероятность непосредственного взаимодействия видимого света с полярным кластером внутри протон-переносящего канала БР.

Вероятно, что такая кластерная структура, состоящая из молекул воды, вблизи высоко консервативных остатков АК и формирующая вместе с ними пространственную сеть водородных связей в кармане ретиналя, как и ретинальный хромофор, отвечает за сбор света, необходимый для работы протонной помпы. Возможно, что обе фоторецепторные системы БР дополняют друг друга.

Выявленные оптические свойства АК в водородосвязанных структурах важны для понимания роли сети водородных связей в регуляции активности родопсино-подобных белков.

Материалы и методы. В работе использовали бактериородопсин, выделенный стандартно из бактерий *H. salinarum* ET-1001. Образцы БР готовили виде пленок (Оптическая плотность БР OD_{568} на длине полны 568 составляла 0.6 - 0.9).

Химически чистые аминокислоты L-лизин моногидрохлорид (L-Lys HCl) и L–аргинин монохлорид (L-Arg HCl) «Реанал» (Венгрия) и глицин «Sigma-Aldrich» использовались без дальнейшей очистки. Растворы АК готовили с использованием деионизованной воды (~18Ω MilliQ H_2O) при 293 К. Концентрации аминокислот составлял 0,5-1,25 М (pH ~6.8).

Спектроскопические измерения проводили с использованием ИК-Фурье-спектрометра ФС-02 (Россия) и спектрофлуориметра Lumina Fluorescence («Thermo Scientific», США), как описано в [16,17]. ИК-Фурье спектр записывали с накоплением 400 сканов и разрешением 4 $см^{-1}$. ИК-эмиссию регистрировали в спектральном диапазоне 4000-400 $см^{-1}$ режиме непрерывного освещения видимым светом ($340< \lambda<730$ нм, мощность 42-660 мВт) при комнатной температуре.

Замедленную флуоресценцию регистрировали в диапазоне сканирования от 320 до 900 нм, используя время задержки между возбуждением и испусканием в 1 и 3 мсек. Длина волны возбуждения варьировалась от 530 до 640 нм с возбуждающей щелью 2 нм и детектирующей щелью 10 нм.

Данные обрабатывали с помощью программы Origin, версии 6.0 и компьютерных программ, входящих в программное обеспечение каждого прибора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spudich JL, Yang CS, Spudich EN. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000;16:365-392.
2. Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, et al. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.* 2014;114(1): 126-163.
3. Urui T, Mizutani Y. Origin of the difference in proton transport direction between inward and outward proton-pumping rhodopsins. *Acc. Chem. Res.* 2024;57(22): 3292-3302.

4. Luecke H, Schobert B, Richter HT, et al. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution. *J. Mol. Biol.* 1999;291(4): 899-911.
5. Mathies RA, Lin SW, Ames JB, et al. From femtoseconds to biology: Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991;20:491-518.
6. Zadok U, Khatchatouriants A, Lewis A, et al. Light-Induced Charge Redistribution in the Retinal Chromophore Is Required for Initiating the Bacteriorhodopsin Photocycle. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124(40):11844-11845.
7. Colonna A, Groma GI, Martin J-L, et al. Quantification of sudden light-induced polarization in bacteriorhodopsin by optical rectification. *J. Phys. Chem. B.* 2007;111(10):2707-2710.
8. Lewis A. The molecular mechanism of excitation in visual transduction and bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978;75(2):549-553.
9. Xu D, Martin C, Schulten K. Molecular dynamics study of early picosecond events in the bacteriorhodopsin photocycle: dielectric response, vibrational cooling and the J, K Intermediates. *Biophys. J.* 1996;70(1):453-460.
10. Aharoni A, Hou B, Friedman N, et al. *Biochemistry (Moscow).* 2001; 66(11):1210-1219.
11. Zadok U, Khatchatouriants A, Lewis A, Ottolenghi M, Sheves M. Light-Induced Charge Redistribution in the Retinal Chromophore Is Required for Initiating the Bacteriorhodopsin Photocycle, *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124(40): 11844-11845.
12. Chen X, Luo W, Ma H, et al. Prevalent intrinsic emission from nonaromatic amino acids and (poly(aminoacids). *Sci. China Chen*. 2018;61(3): 351-359.
13. Garczarek F,·Wang J,·El-Sayed MA,·Gerwert K. The assignment of the different infrared continuum absorbance changes observed in the 3000-1800-cm^{-1} region during the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophysical J.* 2004;87(4):2676-2682.
14. Nie B, Stutzman J, Xie A. A vibrational spectral maker for probing the hydrogen-bonding status of protonated Asp and Glu residues. *Biophysical J.* 2005;88(4):2833-2847.
15. Mathias G, Marx D. Structures and spectral signatures of protonated water networks in bacteriorhodopsin. *PNAS USA.* 2007;104(17):6980-6985.
16.Terpugov EL, Degtyareva OV. Infrared emission from photoexcited bacteriorhodopsin: studies by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 2001; 565-566: 287-292.
17. Терпугов ЕЛ, Удальцов СН, Дегтярева ОВ. Исследование спектральных характеристик L-лизина и L-аргинина с помощью адсорбционной, стационарной и синхронной флуоресцентной спектроскопии. *Биофизика*. 2021;66(5):856-864.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МУТАНТНОГО ВАРИАНТА VEGFR3 C.3175G>C (P.A1059P), АССОЦИИРОВАННОГО С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ

Филина Ю.В.[1], Фейсханов А.К.[1,2], Гайсина Э.А.[2], Мифтахова Р.Р.[1]

[1]ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия
[2]Центр лимфологии ООО Клиника ИМТ «Ангио плюс», Казань, Россия

Введение. Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (VEGFR3) является ключевым регулятором развития лимфатической и кровеносной системы в эмбриогенезе и поддержания структуры лимфатических сосудов на протяжении жизни [1, 2]. VEGF-C является основным лигандом VEGFR3 и ключевым фактором роста, необходимым для эмбрионального лимфангиогенеза [3].

Миссенс-мутации в структуре тирозинкиназного домена VEGFR3, снижающие связывание АТФ и автофосфорилирование рецептора, могут привести к аплазии или гипоплазии компонентов лимфатической системы и развитию первичной лимфедемы 1А (болезнь Милроя) – врожденного заболевания, при котором богатая белком жидкость накапливается в межклеточном пространстве, что приводит к хроническим прогрессирующим отекам, преимущественно в нижних конечностях [4,5].

У пациентов с болезнью Милроя описано более 70 патогенных генетических вариантов, большинство из которых представляют собой однонуклеотидные замены в 17-26 экзонах гена *FLT4*, кодирующего VEGFR3. Ранее при анализе последовательности *FLT4* у пациентов с первичной лимфедемой мы выявили несколько редких генетических вариантов, которые могут влиять на функциональную активность VEGFR3, в том числе гетерозиготные варианты **c.3175G>C (**p.A1059P) и **c.3341C>T (p.P1114L)** [6]. Первичный анализ клинических особенностей пациентов, семейного анамнеза и данных предсказательных алгоритмов показал, что обнаруженные варианты являются вероятно патогенным. Целью данного исследования была оценка функциональной активности VEGFR3 в клетках с гиперэкспрессией мутантных вариантов *FLT4* **c.3175G>C** и **c.3341C>T.**

Материалы и методы. Модельные клеточные линии были получены при помощи трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими *FLT4* дикого типа и мутантные варианты *FLT4*.

Лентивирусные частицы получали с помощью транзиентной трансфекции клеток HEK293FT с использованием кальций-фосфатного метода. В качестве трансферной плазмиды для получения лентивирусов

использовали плазмиду pHAGE-FLT4 из некоммерческого репозитория Addgene (#116745), кодирующую последовательность гена *FLT4* дикого типа (pFLT4). Для получения мутантных вариантов использовали метод сайт-направленного мутагенеза по технологии QuikChange. Были получены плазмиды pHAGE-FLT4 с заменой G>C в позиции 6622 (соответствует *FLT4* **c.3175G>C) и C>T в позиции 6788 (**соответствует *FLT4* **c.3341C>T**).

Выбор клеточной линии для трансдукции проводился на основании оценки уровня экспрессии гена *FLT4* и наличия VEGFR3. Из клеток линий HEK293FT, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 и HCT-116 выделяли РНК, синтезировали кДНК, проводили ПЦР с детекцией в реальном времени и оценивали экспрессию *FLT4* при помощи метода ΔΔCt с нормализацией по референсному гену ACTB. Анализ уровня VEGFR3 в клеточных линиях HEK293FT, MCF-7, MDA MB-231, PC-3, HCT-116, Ovcar-4, A549, 22Rv1 проводили при помощи иммуноблота.

Для анализа активности VEGFR3 клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамина, смеси пенициллина-стрептомицина и 2% эмбриональной бычьей сыворотки в течение 48 часов, затем промывали клетки фосфатным буфером без Ca^{2+} и Mg^{2+} и инкубировали с 100 нг/мл VEGF-C в течение 20 мин при 37°C, переносили на лед и лизировали при помощи RIPA-буфера. Образцы разделяли в 10% ПААГ в денатурирующих условиях, затем переносили на PVDF-мембрану и окрашивали антителами против фосфорилированной формы VEGFR3 (Tyr1230), общего VEGFR3 и GAPDH в качестве контроля загрузки.

Результаты и обсуждение. В результате сайт-направленного мутагенеза были получены плазмиды pHAGE-FLT4 с заменами, соответствующими вариантам *FLT4* **c.3175G>C и c.3341C>T**. Нуклеотидная последовательность участка, кодирующего тирозинкиназный домен, была подтверждена методом прямого секвенирования.

Полученные плазмиды были использованы для сборки лентивирусов. В качестве модели для трансдукции была выбрана клеточная линия PC-3, которая обладала наименьшим уровнем экспрессии *FLT4* среди проанализированных клеточных линий.

Сортировка клеток, несущих трансген, была проведена на основании флуоресценции GFP. В векторе pHAGE-FLT4 гены *FLT4* и *EGFP* разделены элементом IRES и находятся под контролем промотора EF1A, что определяет их совместную транскрипцию.

Через 72 часа после трансдукции доля GFP-положительных клеток в образцах PC3-WT, PC3-3175 и PC3-3341 составила 81, 85 и 89%, соответственно, GFP^+-клетки были отсортированы. После сортировки доля GFP^+-клеток оценивалась каждые 3-5 пассажей, была стабильной на

протяжении 25 пассажей и составляла 97-99% (рис. 1А). Уровень экспрессии *FLT4* в образцах PC3-WT, PC3-3175 и PC3-3341 после трансдукции повышался в 414.5±45.0, 455.49±89.3 и 379.3±56.6 раз по сравнению с контролем, соответственно (рис. 1Б).

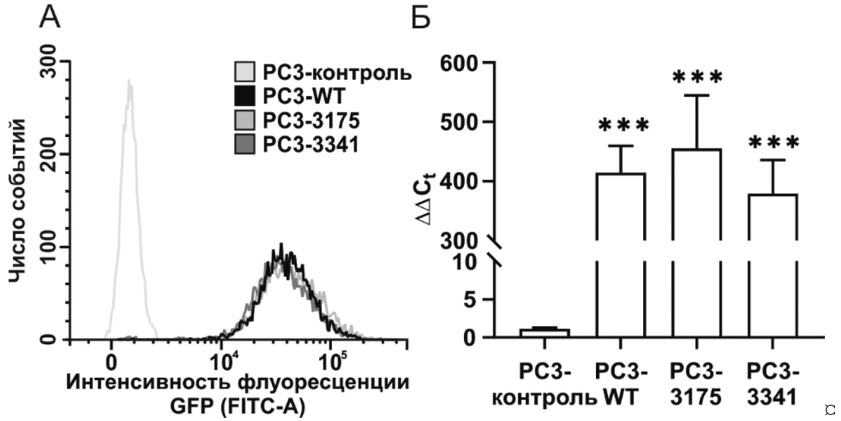


Рис. 1. Экспрессия трансгена в клетках PC-3: А – пример результатов цитофлуориметрического анализа интенсивности флуоресценции GFP в клетках PC-3 после сортировки, пассаж 25, отображено 5 000 событий; Б – относительная нормализованная экспрессия *FLT4* (данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, n=3, пассаж 17, 19, 22; * – $p \leq 0.005$, однофакторный дисперсионный анализ и тест Тьюки; сравнение с контрольными клетками; между трансдуцированными клетками достоверных различий в уровне экспрессии *FLT4* не обнаружено).

Наличие VEGFR3 в клетках после трансдукции также было подтверждено методом иммуноблота. Гликозилированная форма рецептора имеет массу около 195 кДа, частично гликозилированная – 175 кДа; фрагмент массой 125 кДа представляет собой продукт протеолитического расщепления, необходимого для формирования функционального рецептора [3]; полипептиды соответствующего размера были обнаружены в клетках PC3-WT и PC3-3175 (рис. 2). В клетках PC3-3341 VEGFR3 был в основном представлен частично гликозилированной формой размером около 175 кДа.

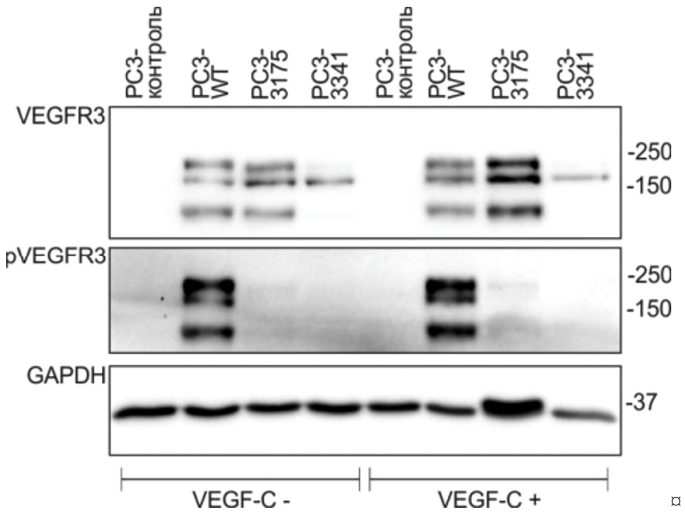


Рис. 2. Пример результатов иммуноблота: уровень VEGFR3 в клетках PC-3 до (PC3-контроль) и после трансдукции вирусными векторами, кодирующими *FLT4* дикого типа (PC3-WT) и мутантные варианты FLT4 (PC3-3175 и PC3-3341), пассаж 26; анализ общего уровня VEGFR3 и фосфорилированной формы рецептора (pVEGFR3), клетки инкубировали с 100 нг/мл VEGF-C (VEGF-C+) или без лиганда (VEGF-C-) в течение 20 мин.

Для оценки функциональной активности мутантных вариантов рецептора исследовали уровень фосфорилированного VEGFR3 после инкубации с лигандом VEGF-C. Известно, что связывание VEGF-C вызывает димеризацию VEGFR3, что стимулирует транс-автофосфорилирование остатков тирозина в активационной петле киназы и околомембранной области, вызывая конформационные изменения, которые служат для стабилизации активного состояния. Фосфотирозины привлекают сигнальные молекулы, имеющие домены SH2 и PTB, что приводит к активации Ras, PI3K и PLCγ, которые активируют и регулируют пролиферацию, миграцию и выживание лимфатических эндотелиальных клеток – процессов, необходимых для формирования лимфатической системы [7].

В клетках, экспрессирующих рецептор дикого типа (PC3-WT) выявлено наличие форсфорилированной формы VEGFR3 как в неактивированных образцах, так и в образцах клеток после инкубации с лигандом. Базовый уровень активации VEGFR3 в культивируемых клетках, по-видимому, связан с присутствием в среде эмбриональной

бычьей сыворотки, содержащей различные факторы роста, в том числе лиганды VEGFR3 VEGF-C и VEGF-D. В образцах клеток PC3-3175 количество pVEGFR3 было значительно ниже, тогда как в образцах PC3-3341, как и в контрольных клетках, pVEGFR3 не детектировался.

Вариант c.3341C>T был впервые описан при изучении семейного случая болезни Милроя, была выявлена сниженная киназная активность и способность к активации транскрипционных факторов AP-1 и NFκB в клетках, экспрессирующих мутантный вариант рецептора [3]. Мы также обнаружили, что в клетках с гиперэкспрессией c.3341C>T (p.P1114L) VEGFR3 не фосфорилируется как под действием сывороточных факторов, так и при инкубации VEGF-C. Преобладание частично гликозилированной формы 175 кДа и снижение количества 125 кДА-фрагмента зрелого рецептора также было ранее продемонстрировано в исследовании Karkkainen и соавторов, которые предположили, что оно может быть связано со сниженной эффективностью процессинга исследованных мутантных вариантов VEGFR3 [3].

Вариант c.3175G>C был ранее описан у пациента со спорадической первичной лимфедемой [8], но его функциональный анализ не проводился. Наши данные демонстрируют, что мутантный вариант VEGFR3 c.3175G>C (p.A1059P) обладает сниженной способностью к автофосфорилированию, что подтверждает его клиническую значимость как фактора риска развития аномалии лимфатической системы и первичной лимфедемы.

Финансирование. Исследование поддержано грантом РНФ 24-24-00410.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Apr 11 1995;92(8):3566-70. doi:10.1073/pnas.92.8.3566
2. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. Science. 1998;282(5390):946-949. doi:10.1126/science.282.5390.946
3. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. Nat Genet. Jun 2000;25(2):153-9. doi:10.1038/75997
4. Szuba A, Shin WS, Strauss HW, Rockson S. The Third Circulation: Radionuclide Lymphoscintigraphy in the Evaluation of Lymphedema. Journal of Nuclear Medicine. 2003;44(1):43-57.
5. Rockson SG, Rivera KK. Estimating the Population Burden of Lymphedema. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008;1131(1):147-154. doi:10.1196/annals.1413.014

6. Feiskhanov A, Ibragimova A, Gaysina E, et al. Identification of a Novel FLT4 c.3028A>C Variant Associated With Milroy Disease. Clin Genet. May 2025;107(5):541-546. doi:10.1111/cge.14671
7. Monaghan RM, Page DJ, Ostergaard P, Keavney BD. The physiological and pathological functions of VEGFR3 in cardiac and lymphatic development and related diseases. Cardiovasc Res. Jul 7 2021;117(8):1877-1890. doi:10.1093/cvr/cvaa291
8. Liu N, Gao M. FLT4 Mutations Are Associated with Segmental Lymphatic Dysfunction and Initial Lymphatic Aplasia in Patients with Milroy Disease. Genes (Basel). Oct 13 2021;12(10)doi:10.3390/genes12101611

Кальциевая сигнализация

ДИНАМИЧЕСКИЙ СЕТЕВОЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ

Асташев М.Е.[1,2]

[1]Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Московская область, Россия

Введение. Взаимодействие между клетками превращает популяцию клеток с ограниченным набором функциональных реакций в сложную систему. Эта система зачастую обладает новыми свойствами, которые не являются простой суммой свойств отдельных клеток [1]. Это свойство сложных систем – эмерджентность – означает, что изучение биологических объектов «снизу вверх», то есть анализ отдельных элементов и структуры системы без учета результатов её работы в виде метаболитов или динамики ключевых параметров, которые можно измерить, не позволяет объяснить многие эффекты, наблюдаемые в биологических системах. В результате, перспективными способами изучения и описания сложных биологических систем становятся 4D биология [2,3] и системная биология [4]. В первом случае структурная информация дополняется описание процесса жизнедеятельности биологической системы во времени. Системная биология, не отрицая значимости первого подхода к сбору и описанию экспериментальных данных, предлагает более общий взгляд на организацию научной работы. Этот подход можно представить в виде цикла, состоящего из нескольких этапов. [5]: теоретический анализ имеющихся данных, построение математической модели системы, симуляция, формирование гипотезы, дизайн эксперимента и разработка экспериментального оборудования, биологический эксперимент, описание экспериментальных данных и переход в начало цикла. Первые четыре этапа относятся к вычислительной биологии (dry biology), последующие - к экспериментальной (wet biology) [6]. Несмотря на перспективность подхода системной биологии, примеров успешной реализации экспериментального исследования процессов внутри- и межклеточной коммуникации не много [7], но в то же время теоретических исследований значительно больше, что указывает на наличие дефицита подходящих экспериментальных методик и методов

анализа данных [2]. Ранее нами была разработана уникальная широкопольная микрофлуориметрическая система [8], позволяющая проводить одновременные, синхронные измерения флуоресцентого сигнала при длинах волн возбуждения 340, 380 и 490 нм, что обеспечивает измерение внутриклеточной концентрации кальция (с помощью зонда Fura-2AM в ратиометрическом режиме) и внутриклеточной концентрации NO (с помощью зонда DAF-FM) с периодом дискретизации 1-2 с. В систему также интегрирован контроллер температуры образца. Данная система была протестирована на отсутствие артефактов в виде собственных периодических колебаний. Данная система, при использовании объектива 10х позволяет получить временные ряды спонтанной динамики внутриклеточных концентраций кальция и NO от более чем 400 культивируемых эндотелиоцитов при конфлуэнтности 70-90%.

Материалы и методы. Эндотелиальные клетки, находящиеся в микрососудах кожи мыши, были выделены из фрагментов дермы, полученных из хвоста животного. Для этого был использован метод седиментации на градиенте плотности Перколла, описанный в литературе [9-11]. Регистрация флуоресценции проводилась в течение 15 минут при температуре 37°C и 20 минут при 40°C (тепловая проба). Для последующего анализа использовались данные последних 15 минут записи, после того как температура стабилизировалась (рис. 1). Параметры экспозиции, мощность освещения и усиление камеры оставались неизменными для всех образцов [12]. Первичные экспериментальные данные (стеки изображений) были собраны с помощью программного обеспечения WinFluorXE [13]. Последующий анализ стеков проводился с использованием программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США). Анализ синхронных процессов в популяции клеток проводили с помощью основанного на вейвлет-преобразовании биспектрального анализа [14].

Результаты. В основе биспектрального анализа лежит расчёт интегральных комплексных корреляционных характеристик вейвлет-коэффициентов временных рядов с использованием формулы:

$$\rho_{123}(\omega_1,\omega_2) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_1(t,\omega_1)\Phi_2(t,\omega_2)\overline{\Phi_3(t,\omega_1+\omega_2)}dt =$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} A_1A_2A_3e^{j(\phi_1+\phi_2-\phi_3)}dt = \int_{-\infty}^{\infty} A_1A_2A_3e^{j\Delta\phi}dt,$$

$$\Delta\phi = \varphi_1+\varphi_2-\varphi_3-t(\omega_1+\omega_2-(\omega_1+\omega_2)) = \varphi_1+\varphi_2-\varphi_3.$$

где ρ_{123} – это значение показателя биспектра, полученное в результате

вычислений для частот ω_1 и ω_2, а также для трёх сигналов, которые были зарегистрированы одновременно. Φ_1, Φ_2 и Φ_3 – это комплексные коэффициенты, полученные в результате вейвлет-разложения в момент времени t для частот ω_1, ω_2 и $\omega_1+\omega_2$, соответственно. Ранее [15-17] мы подробно описали условия для получения высоких показателей биспектра, связанные с появлением в сигнале новых спектральных компонентов, являющихся результатом нелинейных гармонических искажений исходных ритмических компонент.

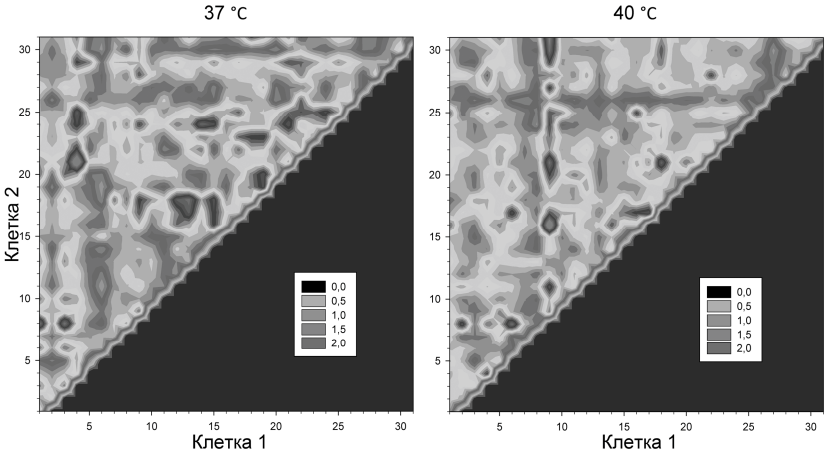


Рис. 1. Изменение синхронизации популяции клеток, оцененной по показателю биспектра $\overline{\rho}_{12}(\omega_1,\omega_2)$ для временных рядов внутриклеточной концентрации кальция при увеличении температуры среды от 37 до 40°C.

Если рассматривать более конкретный случай анализа двух сигналов, то можно предложить два способа вычисления биспектра:

$$\rho_{121}(\omega_1,\omega_2)=\int_{-\infty}^{\infty}\Phi_1(t,\omega_1)\Phi_2(t,\omega_2)\overline{\Phi_1(t,\omega_1+\omega_2)}dt,$$

$$\rho_{122}(\omega_1,\omega_2)=\int_{-\infty}^{\infty}\Phi_1(t,\omega_1)\Phi_2(t,\omega_2)\overline{\Phi_2(t,\omega_1+\omega_2)}dt,$$

то есть, формула для вычисления биспектра (в отличие от фазовой когерентности, например) не являются симметричной относительно перестановки сигналов. Благодаря этой асимметрии можно решить задачу определения источников и приёмников сигнала в сетевой структуре взаимодействия клеток, имея синхронные временные ряды от узлов этой сети и предложить параметр «направления передачи»:

$$\Delta\rho(\omega_1,\omega_2) = \rho_{121}(\omega_1,\omega_2) - \rho_{122}(\omega_1,\omega_2),$$

где ρ_{121} и ρ_{122} предполагаются обезразмеренными с помощью соответствующей амплитудной нормировки. Для вычисления показателя без учета «направления», разумно использовать следующую формулу:

$$\overline{\rho}_{12}(\omega_1,\omega_2) = (\rho_{121}(\omega_1,\omega_2) + \rho_{122}(\omega_1,\omega_2))/2.$$

Такой показатель биспектра является критерием синхронизации частотных компонентов двух временных рядов. Пример оценки изменения синхронизации в популяции эндотелиоцитов при увеличении температуры приведен на рис. 1.

На рис. 1 видно, что при увеличении температуры от 37 до 40°C, количество клеток с высокими показателями биспектра увеличивается. Кроме того, появляются клетки, синхронизованные с большей частью популяции, например, обращает на себя внимание клетка с номером 9.

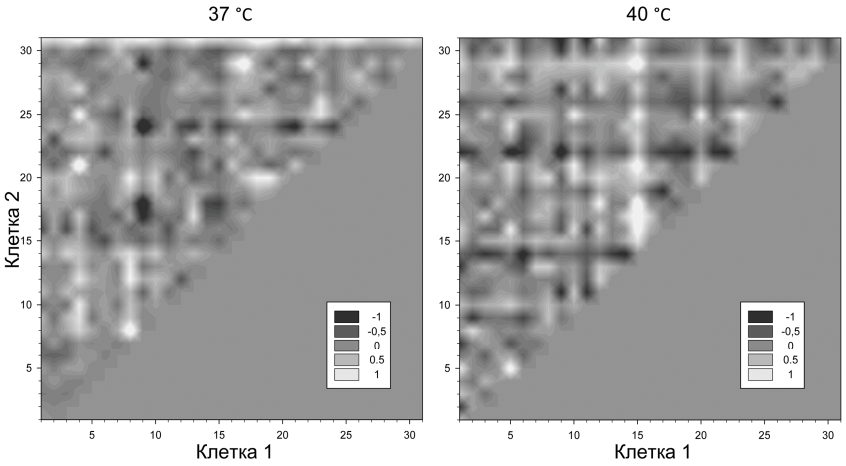


Рис. 2. Изменение распределения параметра направления передачи $\Delta\rho$ сигналов кальциевой сигнализации при увеличении температуры от 37 до 40°C в культуре эндотелиоцитов.

При оценке направления передачи (рис. 2), при температуре 37°C, наблюдается небольшое количество клеток приемников (номера 9, 14) и передатчиков (4, 8, 24), при увеличении температуры увеличиваются как количество клеток с ярко выраженной функцией приемников (9, 11, 20, 29) и передатчиков (9, 14, 22, 24, 30), так и величины параметра $\Delta\rho$ для клеток. При анализе большого количества независимых экспериментов

(n=4, рис. 3) при увеличении температуры растет величина показателя биспектра, однако, распределение пиковых значений по частоте заметно не изменяется и попадает в диапазон эндотелиального ритма микроциркуляции.

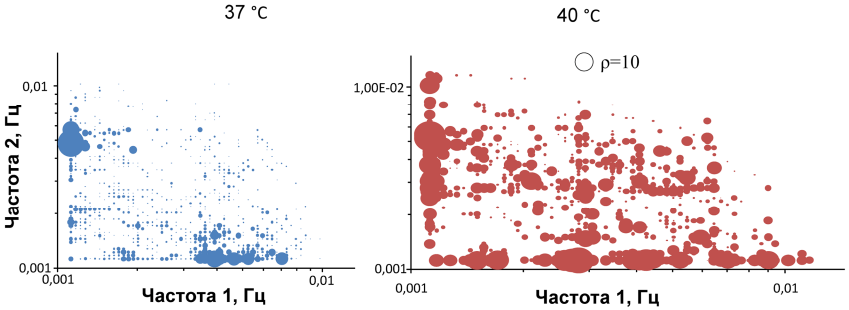


Рис. 3. Распределение пиков по частотам и изменение пиковых значений на картах биспектра временных рядов динамики внутриклеточной концентрации кальция при температуре 37 и 40°C в культуре эндотелиоцитов. n=4

Заключение. При увеличении температуры культура эндотелиоцитов переходит в состояние более высокой синхронизации ритмических процессов, характерных для эндотелиального ритма в микрососудистом русле. Биспектральный анализ выявляет не просто факт синхронизации двух временных рядов, но и показывает наличие в сигналах продуктов нелинейных гармонических искажений. Разницу в амплитуде этих искажений можно учесть посредством введенного нами параметра $\Delta\rho$, что позволяет определить направление передачи сигнала, а следовательно и структуру сети с учетом направления трансдукции сигнала в ней в рамках подхода системной биологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. von Bertalanffy L. The Theory of Open Systems in Physics and Biology // Science. – 1950. – Т. 111, № 2872. – С. 23-29. DOI: 10.1126/science.111.2872.23
2. Schöneberg J., Dambournet D., Liu T.-L., Forster R., Hockemeyer D., Betzig E., Drubin D. G., Barber D. 4D cell biology: big data image analytics and lattice light-sheet imaging reveal dynamics of clathrin-mediated endocytosis in stem cell–derived intestinal organoids // Molecular Biology of the Cell. – 2018. – Т. 29, № 24. – С. 2959-2968. DOI: 10.1091/mbc.E18-06-0375
3. K. S A., Sarkar S., Vishnu S., S. R R., Negi S., Narendradev N. D., Arora R. H., Sanam S., P. V A., Sharma R., Khurana S., Varghese J., Srinivasula S. M., Singh M. S. Real-time study of spatio-temporal dynamics (4D) of physiological activities in alive biological specimens with different FOVs and resolutions simultaneously // Scientific Reports. – 2024. – Т. 14, № 1. DOI: 10.1038/s41598-024-52152-x

4. Zieglgansberger W., Tolle T. R. The pharmacology of pain signalling // Curr Opin Neurobiol. – 1993. – Т. 3, № 4. – С. 611-8. DOI: 10.1016/0959-4388(93)90063-5
5. Kitano H. Systems Biology: A Brief Overview // Science. – 2002. – Т. 295, № 5560. – С. 1662-1664. DOI: 10.1126/science.1069492
6. Bruggeman F. J., Westerhoff H. V. The nature of systems biology // Trends in Microbiology. – 2007. – Т. 15, № 1. – С. 45-50. DOI: 10.1016/j.tim.2006.11.003
7. Fröhlich F., Kessler T., Weindl D., Shadrin A., Schmiester L., Hache H., Muradyan A., Schütte M., Lim J.-H., Heinig M., Theis F. J., Lehrach H., Wierling C., Lange B., Hasenauer J. Efficient Parameter Estimation Enables the Prediction of Drug Response Using a Mechanistic Pan-Cancer Pathway Model // Cell Systems. – 2018. – Т. 7, № 6. – С. 567-579.e6. DOI: 10.1016/j.cels.2018.10.013
8. Асташев М. Е. Open-source установка для микрофлуоресцентного Ca^{2+}-анализа // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : сборник статей Международной конференции / Под ред. Зинченко В. П. Б. А. В. – Т. 1 – Пущино, 22–25 мая 2017 года. , 2017. – С. 397-403.
9. Cha S. T., Talavera D., Demir E., Nath A. K., Sierra-Honigmann M. R. A method of isolation and culture of microvascular endothelial cells from mouse skin // Microvascular Research. – 2005. – Т. 70, № 3. – С. 198-204. DOI: 10.1016/j.mvr.2005.08.002
10. Hou H., Li J., Zhou L., Liang J., Wang J., Li J., Hou R., Li J., Yang X., Zhang K. An effective method of isolating microvascular endothelial cells from the human dermis // Cell Biology International. – 2020. – Т. 44, № 12. – С. 2588-2597. DOI: 10.1002/cbin.11448
11. Talavera-Adame D., Ng T. T., Gupta A., Kurtovic S., Wu G. D., Dafoe D. C. Characterization of microvascular endothelial cells isolated from the dermis of adult mouse tails // Microvascular Research. – 2011. – Т. 82, № 2. – С. 97-104. DOI: 10.1016/j.mvr.2011.04.009
12. Serov D., Tankanag A., Astashev M. Low-frequency oscillations of murine skin microcirculations and periodic changes of [Ca2+]i and [NO]i levels in murine endotheliocytes: An effect of provocative tests // Cell Biology International. – 2021. – Т. 46, № 3. – С. 427-442. DOI: 10.1002/cbin.11743
13. John D. Strathclyde Electrophysiology Software. –. – URL: http://spider.science.strath.ac.uk/ sipbs/software_ses.htm.
14. Newman J., Pidde A., Stefanovska A. Defining the wavelet bispectrum // Applied and Computational Harmonic Analysis. – 2021. – Т. 51. – С. 171-224. DOI: 10.1016/j.acha.2020.10.005
15. Astashev M.E. G. A. A., Serov D.A., Simakin A.V., Yusim V.A., Tankanag A.V. Study Of The Synchronization And The Transmission Of Gating Modulation In The Single Potassium Channel // Opera Medica Et Physiologica. – 2024. – Т. 11, № 3. – С. 158-173. DOI: 10.24412/2500-2295-2024-3-158-173
16. Astashev M. E., Burmistrov D. E., Yanykin D. V., Grishin A. A., Knyazeva I. V., Dorokhov A. S., Gudkov S. V. Application of Bispectral Analysis to Assess the Effect of Drought on the Photosynthetic Activity of Lettuce Plants Lactuca sativa L // Mathematical and Computational Applications. – 2024. – Т. 29, № 5. DOI: 10.3390/mca29050093
17. Astashev M. E., Serov D. A., Tankanag A. V., Knyazeva I. V., Dorokhov A. A., Simakin A. V., Gudkov S. V. Study of the Synchronization and Transmission of Intracellular Signaling Oscillations in Cells Using Bispectral Analysis // Biology. – 2024. – Т. 13, № 9. – С. 685. DOI: 10.3390/biology13090685

ТЕТРАПЕПТИД НАЕЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЕ НА КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Баженов П.А.[1], Винокуров А.Ю.[1], Козин С.А.[1,3], Абрамов А.Ю.[1,2]

[1]Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия
[2]UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK
[3]Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Введение. Рядом исследований показано, что тетрапептид НАЕЕ, состоящий из остатков гистидина, аланина и глутаминовой кислоты, ввиду способности к связыванию с β-амилоидом препятствует образованию амилоидных бляшек [1], а также взаимодействуя с никотиновым ацетилхолиновым рецептором, предотвращает его ингибирование β-амилоидом [2], что делает НАЕЕ перспективным активным соединений для коррекции нейродегенеративных процессов. НАЕЕ входит в структуру первичного транскрипта гена альфа-субъединицы потенциал зависимого кальциевого канала (CaV2.2), но вырезается при дальнейшем процессинге белка [3] и выделяется во внеклеточную среду, обнаруживаясь в системной кровотоке. В связи с этим значительный интерес представляет физиологическое влияние тетрапептида на здоровые клетки мозга. С учетом происхождения НАЕЕ, а также ввиду критической важности кальциевого гомеостаза для нейронов и астроцитов в рамках настоящей работы был исследован эффект тетрапептида на развитие внутриклеточного кальциевого сигнала.

Материалы и методы. Первичную нейрон-глиальную культуру выделяли из коры головного 1-3-дневных крысят линии Wistar по стандартной методике [5]. Эксперименты по измерению цитозольной концентрации кальция проводили с помощью одноволнового зонда Fluo-4 AM (5 мкМ) на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900 и ратиометрического зонда Fura-2AM (5 мкМ) на широкопольном флуоресцентном микроскопе. В зависимости от дизайна эксперименты выполнены в среде полного сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) (KH_2PO_4, Na_2HPO_4, $NaHCO_3$, NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2x6H_2O$, $MgSO_4x7H_2O$, D-глюкоза, HEPES) или HBSS без кальция.

Статистический анализ полученных данных по критерию Манна-Уитни и построение графиков для представления результатов проводили с использованием программного обеспечения Origin 2021.

Результаты. В целях дифференцированной оценки НАЕЕ на кальциевый сигнал в клетках использовали стимулирование астроцитов путем добавки АТФ (20 мкМ), нейронов – KCl (50 мМ). Для получения амплитуды максимального ответа в конце эксперимента вносили иономицин и сульфат марганца. Как видно из представленных на рисунке 1 данных, добавка тетрапептида (2 мкМ) вызывает развитие кальциевого сигнала в астроцитах (рис. 1В), в то время как в нейронах аналогичного эффекта не выявлено (рис. 1Г).

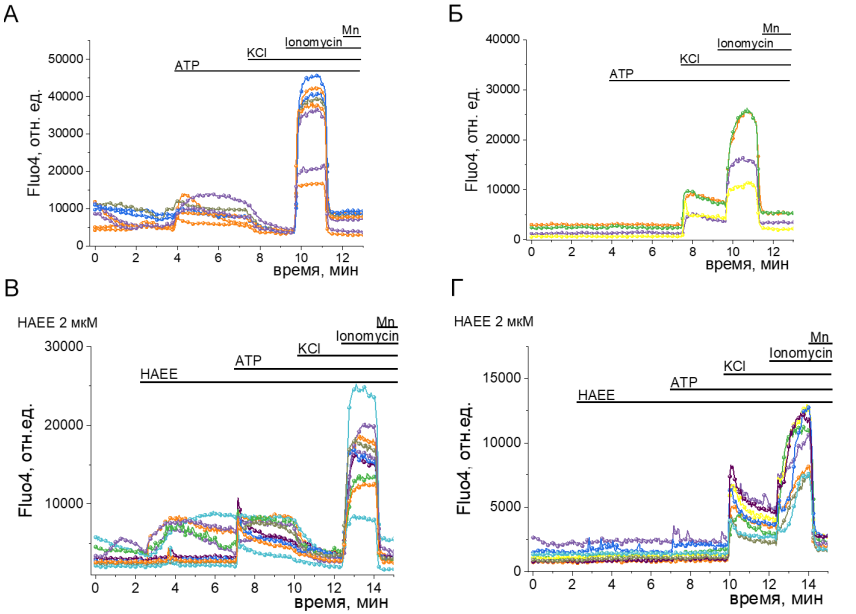


Рис. 1. Тетрапептид НАЕЕ вызывает кальциевый сигнал в клетках мозга. Репрезентативные графики изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4 в астроцитах (А, В) и нейронах (Б, Г).

Для того, чтобы оценить, степень влияния концентрации тетрапептида на вызываемые им изменения кальциевого гомеостаза в серии экспериментов были посчитаны амплитуды кальциевого сигнала, вызванного в ответ на добавку АТФ у астроцитов (рис. 2А) и в ответ на добавку KCl у нейронов (рис. 2Б).

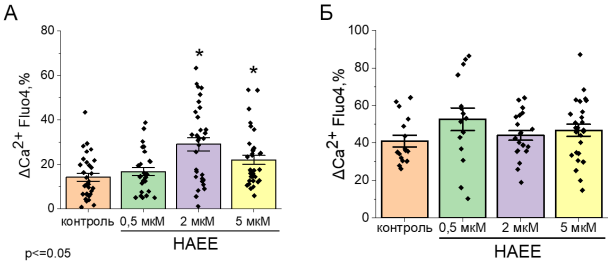


Рис. 2. Амплитуда АТФ-зависимого кальциевого сигнала в астроцитах изменяется под воздействием разных концентраций НАЕЕ. Результаты статистической обработки нормированной амплитуды кальциевого сигнала в клетках в ответ на АТФ (А) и KCl (Б).

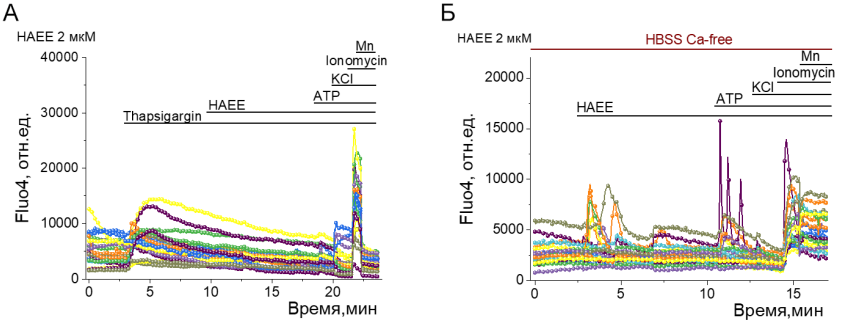


Рис. 3. Ассоциированный с НАЕЕ кальциевый сигнал связан с высвобождением Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Репрезентативные графики изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4 в эксперименте с опустошением ЭПР (А) и на среде без кальция (Б).

Значительный интерес представляет источник увеличения цитозольной концентрации кальция, вызванного тетрапептидом. Эксперименты с ингибитором кальциевой АТФазы тапсигаргином (рис. 3А) показали, что отсутствие ретикулярного кальция убирало связанный с тетрапептидом кальциевый сигнал, в то время как отсутствие кальция во внеклеточной среде (рис. 3Б) никак не отразилось на активности НАЕЕ. Таким образом, наблюдаемый эффект связан с ассоциированным с НАЕЕ высвобождением кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

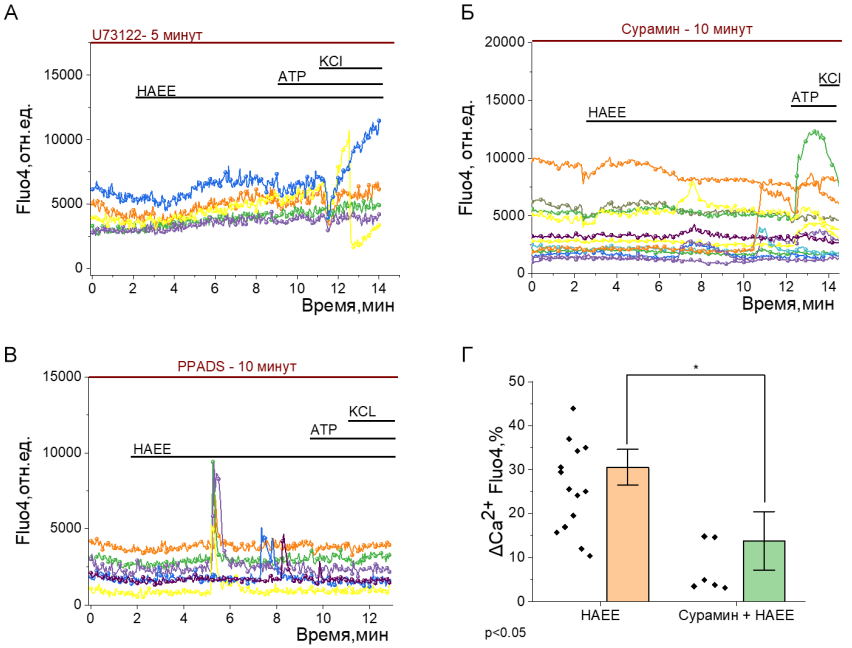


Рис. 4. Эффект тетрапептида HAEE связана с метаботропными пуринорецепторами и активацией фосфолипазы С. Репрезентативные графики изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4 в эксперименте U73122 (А), сурамином (Б), PPADS (В). Влияние сурамина на амплитуду HAEE-ассоциированного кальциевого ответа (Г).

Для того, чтобы выяснить механизм появления кальциевого сигнала вызываемого тетрапептидом, были проведены эксперименты с ингибиторами фосфолипазы С (U73122), пуринорецепторов (сурамин), а также опосредованной G-белком передачи сигналов (PPADS) [4]. Использование ингибитора фосфолипазы С (U73122) приводило к полному отсутствию кальциевого сигнала в ответ на тетрапептид (рис. 4А). При этом стоит отметить, что ингибитор негативно влиял на состояние клеток. Однако ни сурамин, ни PPADS (рис. 4Б,В) полностью не исключало развитие HAEE-ассоциированного кальциевого сигнала в клетках. Однако сурамин все же снижал амплитуду кальциевого сигнала в ответ на HAEE (рис. 4Г), а также число отреагировавших клеток. В совокупности полученные результаты свидетельствуют, что развитие кальциевого сигнала в астроцитах происходит преимущественно через

активацию метаботропных рецепторов и фосфолипазы С, которая в свою очередь приводит к высвобождению ретикулярного кальция через IP3R (рис. 4Г).

Ввиду тесной связи астроцитов и нейронов, образующих рабочую синаптическую сеть, а также способности астроцитов регулировать пластичность и синхронную активность сети за счет быстрого высвобождения глутамата [6] были проведены эксперименты по оценке влияния тетрапептида в различных концентрациях на кальциевый сигнал в нейронах в ответ на добавку глутамата (10 мкМ) (рис. 5).

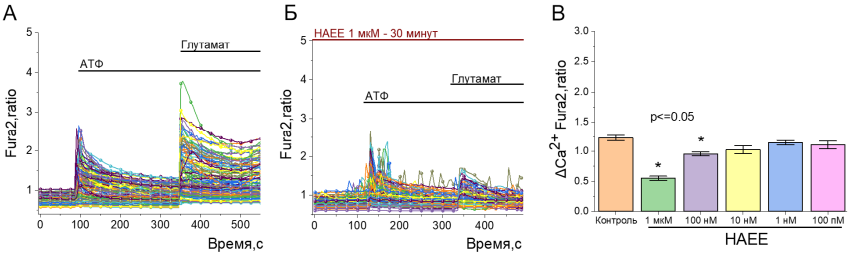


Рис. 5. Дозозависимое снижение амплитуды кальциевого сигнала в нейронах в ответ на добавку глутамата. Репрезентативные графики изменения сигнала Fura-2 в контрольном эксперименте (А) и при предварительном инкубировании клеток с HAEE в концентрации 1 мкМ (Б)(А-Б). Результаты статистической обработки данных амплитуды кальциевого ответа на глутамат (В).

Как следует из представленных данных, HAEE вызывает дозозависимое снижение амплитуды кальциевого сигнала, которое является статистически значимым вплоть до концентрации 100 нМ.

Заключение. Тетрапептид HAEE обладает собственной физиологической активностью в отношении клеток коры головного мозга, вызывая связанно с активацией метаботропных рецепторов развитие кальциевого сигнала и снижение АТФ-зависимого увеличения концентрации цитозольного кальция в астроцитах, а также дозозависимое уменьшение амплитуды кальциевого сигнал в нейронах в ответ на глутамат.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2025-011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsvetkov P. O. et al. Peripherally applied synthetic tetrapeptides HAEE and RADD slow down the development of cerebral β-amyloidosis in AβPP/PS1 transgenic mice //Journal of Alzheimer's Disease. – 2015. – Т. 46. – №. 4. – С. 849-853
2. Barykin E. P. et al. Tetrapeptide Ac-HAEE-NH2 protects α4β2 nAChR from inhibition by Aβ //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 17. – С. 6272.
3. Zolotarev YA, Mitkevich VA, Shram SI, Adzhubei AA, Tolstova AP, Talibov OB, Dadayan AK, Myasoyedov NF, Makarov AA, Kozin SA. Pharmacokinetics and Molecular Modeling Indicate nAChRα4-Derived Peptide HAEE Goes through the Blood–Brain Barrier. Biomolecules. 2021; 11(6):909. https://doi.org/10.3390/biom11060909
4. Brown S. G. et al. Actions of a series of PPADS analogs at P2X1 and P2X3 receptors //Drug development research. – 2001. – Т. 53. – №. 4. – С. 281-291.
5. Vinokurov A.Y. et al. Energy substrate supplementation increases ATP levels and is protective to PD neurons // Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. Elsevier, 2024. Vol. 6. P. 100187
6. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. Cells. 2019 Feb 20;8(2):184.

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ НАТИВНЫХ МЕМБРАН И ЛИПИДНЫЙ МАТРИКС

Борисова М.П.[1], *Катаев А.А.*[2], *Поцелуева М.М.*[1,3]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
[3]Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшей школы «Российский биотехнологический университет» (РОСБИОТЕХ), Пущино, Россия

Резюме. В работе сравнивается действие известных флавоноидов на клеточную мембрану функционирующей клетки и на БЛМ. Эти флавоноиды относятся к разным группам. Танин (3,6-бис-О-дигаллоил-1,2,4-три-О-галлоил-β-*D*-глюкоза) относится к группе гидролизуемых танинов, дигидрокверцетин (он же таксифолин) к группе дигидрофлавонолов. Полученные факты свидетельствуют о некоторых общих свойствах данных веществ, которые в своей структурной основе имеют полифенольный каркас – это проникновение в гидрофобную область мембран и образование ионных каналов. Приведенные факты выявляют также и различия (разная селективность, различный путь блокирования Са-зависимых хлорных каналов). которые можно соотнести с разницей в химической структуре этих молекул

Введение. Полифенолы относятся к тем веществам, которые ежедневно находятся во взаимодействии с организмом человека. Их влияние на естественные процессы организма изучались давно и сложились в некоторые медицинские рекомендации. Предполагается два механизма действия полифенолов на мембраны. Первый связан с образованием мостика через водород гидроксильных групп полифенола на кислород головной группы липида мембран. Второй подход связан с электростатическим взаимодействием заряженных групп липидов и белков клеточной мембраны с зарядом, который несут полифенолы. Исследовано и установлено, что более полярные флавоноиды хорошо связываются с заряженными группами белков и липидов на поверхности мембран, менее полярные проникают в гидрофобную область. Биоактивность полифенолов авторы связывают с изменением физических свойств мембран при действии этих веществ, в частности, изменяется «текучесть» мембран.

Целью нашего исследования было сравнение действия полифенолов, относящихся к различным группам, на функции живой

клетки и на искусственный бислой. Непосредственная задача, стоящая перед нами, заключалась в сравнении воздействия гидролизуемого танина (3,6-бис-О-дигаллоил-1,2,4-три-О-галлоил-β-*D*-глюкоза) и дигидрокверцетина ($(C_{15}H_{12}O_7)$ на природную мембрану водоросли *Chara corallina* и искусственную липидную мембрану. Исследуемые флавоноиды относятся к разным группам: танин (3,6-бис-О-дигаллоил-1,2,4-три-О-галлоил-β-*D*-глюкоза) к группе гидролизуемых танинов, а дигидрокверцетин (он же таксифолин) к группе дигидрофлавонолов. Представленный дигидрокверцетин получен из лиственницы и, следственно, представляет собой (+) 2R,3R- форму.

Материалы и методы. В работе использован гидролизуемый танин, полученный из листьев сумака (*Rhus typhina L.*). Данный танин получен и идентифицирован в Институте биоорганической химии РУз АН по методам, описанным в работах [1]. Дигидрокверцетин (таксифолин) был получен из природного сырья методом, запатентованным как Ru 2330677.2008.. Для корректности сравнения в экспериментах использовали растворы полифенолов в DMSO, хотя танин был водорастворим. Измерения токов на клетке водоросли Chara corallina проводили в режиме фиксации напряжения на рабочем участке клетки длиной 2 мм классическим четырехэлектродным методом [2,3]. Трансмембранный ток разных клеток сравнивали по плотности тока ($А/м^2$). Напряжение на мембране фиксировали на уровне потенциала покоя. Для фиксации напряжения и измерения тока использовали усилитель Dagan 8500 (США). В качестве управляющих и регистрирующих устройств использовали два компьютера с платами ЦАП/АЦП Data Translation DT2801A и Lcard 1250. Мониторинг осуществляли с помощью пакетов программ Bio-Qest и Pclamp 6. Клетки водоросли в эксперименте находились в растворе, содержащем (в мМ): 0,1 KCl, 1,0 NaCl, 1,0 $CaCl_2$, 1,0 HEPES-трис, pH=7,3. В этих условиях клетка находится в жизнеспособном состоянии и может функционировать без изменения параметров сутки и более. Для образования искусственного бислоя использовали метод Мюллера-Рудина [4], наслаивая липид на отверстие в тефлоновой перегородке, разделяющей два солевых раствора. Для фиксации напряжения и регистрации тока использовали усилитель Keithley 308. В качестве управляющих и регистрирующих устройств использовали компьютер с платой ЦАП/АЦП DT2801A и специализированную программу «БЛМ», разработанную А.Я. Зильберштейном. На рисунках с бислойными мембранами знак потенциала указан для отсека с задающим электродом (виртуальная земля, *in*). Липидный раствор состоял из соевого лецитина (*L*α-фосфатидилхолин Type IV–S) 20 мг/мл и 5% холестерина. Растворы солей NaCl и KCl в указанных концентрациях имели pH=7,3. Испытуемое вещество всегда вносилось в отсек с регистрирующим электродом (*out)*.

Результаты. Наши исследования на бислойном липидном матриксе выявили способность гидролизуемого танина образовывать ионные каналы в бислое [5]. Мембраны в присутствии этого танина становятся избирательными для прохождения ионов Cl^-. Потенциал реверсии при десятикратном градиенте проникающего иона (в NaCl) равен 47 мВ.

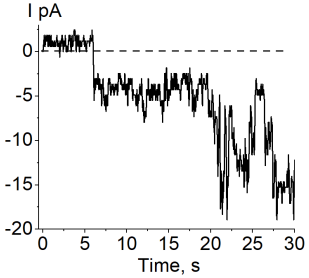


Рис. 1. Флуктуации тока на БЛМ при внесении 5мкг/мл танина с одной стороны от мембраны (*out*). липид S.b. +5% холест; NaCl – 0.2 М; U = 100; -100 мВ.

При действии дигидрокверцетина (ДГК) на липидный бислой была выявлена способность этого вещества, так же как и гидролизуемый танин, образовывать ионные каналы. Специальные исследования показали, что используемый нами в этой работе растворимый дигидрокверцетин по своим свойствам не отличается от природного дигидрокверцетина. На рисунке 3 видно, что мембрана в присутствии ДГК изменяет проводимость. Потенциал нулевого тока при десятикратном градиенте NaCl равен 25 мВ и имеет анионную природу. При положительном потенциале со стороны ДГК проводимость мембраны выше, и скачки тока больше, чем при отрицательном потенциале (Рис. 2)

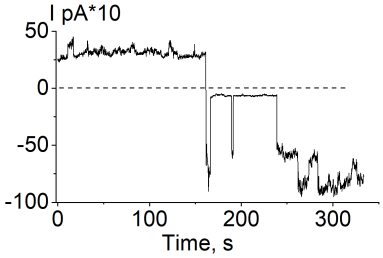


Рис. 2. Флуктуации тока на БЛМ при внесении ДГК 72 мкг/мл с одной стороны от мембраны (*out*). KCl 1M, липид S.b. +5% холест; U = 100; -100 мВ.

Дигидрокверцетин и танин не изменяют проводимость мембраны сразу после добавления в раствор, но требуют ожидания 15-30 минут в зависимости от вносимой концентрации вещества и концентрации соли в омывающем растворе. На рисунках 4 видно повышение проводимости мембраны для танина через 12 минут после внесения нескольких μg таннина с одной стороны. Ток достигает значений десятков pA. Исходно мембрана имеет проводимость 2-3 pA.

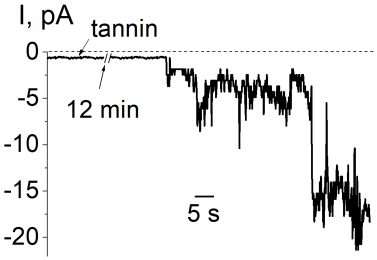


Рис. 3. Колебания тока на мембране. Липид- фосфатидилхолин в гептане 20 мг/мл + 5% холестерин, танин 2,4 мкг (выход), **1 M NaCl**. Напряжение на мембране – 100 мВ.

Дигидрокверцетин, в концентрации большей почти на 2 порядка, увеличивает проводимость мембраны на 4 порядка через 40 минут после внесения в раствор KCl (рис. 4)

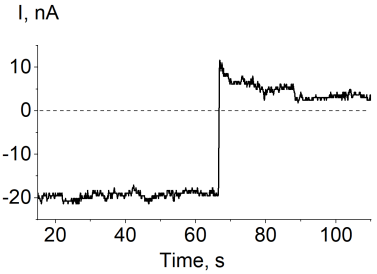


Рис. 4. Флуктуации тока через мембрану в присутствии DGK 200 мкг/мг (*out*), через 42 мин. после внесения. Раствор KCl 1 M; напряжение на мембране -100 мВ: 100 мВ. Липид s.b.+5% cholesterol

Действие на мембрану испытуемых флавоноидов развивается во времени. В зависимости от концентрации действующего агента падение сопротивления мембраны в некоторых случаях приближается к уровню сопротивления электродов за 0.5 - 3 часа. Для иллюстрации этого эффекта

нами приведены вольтамперные характеристики в присутствии ДГК с одной стороны снятые в течение 32 минут (Рис. 5). На рисунке видно, что после 25 минут токовые характеристики мембраны почти совпадают.

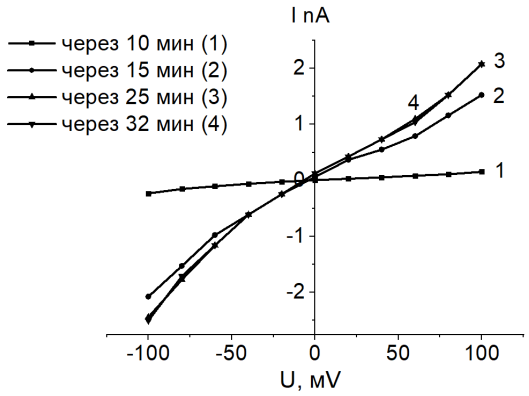


Рис. 5. Вольтамперные характеристики мембраны в присутствии 200 мкг/мл ДГК в зависимости от времени внесения. Все вольтамперные характеристики сняты на одной мембране. ДГК 200 мкг/мл (out); липид S.b. +5% холест; KCl 1M.

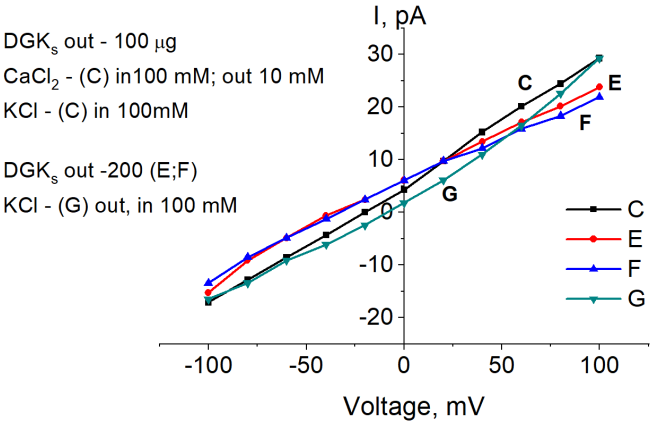


Рис. 6. Вольтамперные характеристики мембраны в условиях градиента концентраций по $CaCl_2$. DGK вносился со стороны 10мМ $CaCl_2$ (*out)*. Потенциал фиксировался (-30 мВ). Затем вносился KCl 100мМ с противоположной стороны, потенциал убирался практически до нуля.

Для исследования действия флавоноидов на плазматическую мембрану и ионные каналы мы использовали клетки водоросли *Chara corallina*. Ca^{2+}-активируемый хлорный ток, который отвечает за развитие потенциала действия в плазмалемме *Chara corallina*, блокируется гидролизуемым танином в концентрациях, начиная от 1 мкг/мл [5]. Дигидрокверцетин также как и танин изменяет вольтамперную характеристику плазмалеммы, но действующие концентрации выше (от 5 мкг/мл). Эффект блокирования трансмембранного тока в присутствии ДГК также, как и в случае действия гидролизуемого танина, развивается во времени (Рис. 7).

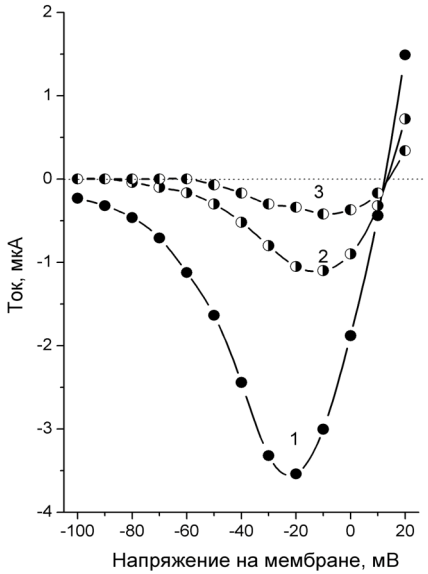


Рис. 7. Изменение вольтамперной характеристики мембраны клеток *Chara corallina* при действии ДГК. 1 – контроль, 2 – через 5 минут после добавления 500 мкг/мл ДГК, 3 – через 10 минут.

Трансмембранный ток плазмалеммы *Chara corallina* обеспечивается в основном Ca-зависимым хлорным током. При увеличении концентрации Ca^{2+} снаружи клетки с 1 мМ до 20 мМ происходит инактивация кальциевых каналов и развивается хлорный ток. Эти события следуют друг за другом, и за счет этого две компоненты тока (Ca и Cl) разделяются во времени. Учитывая фактор временного различия можно увидеть действие дигидрокверцетина отдельно на кальциевый и хлорный токи. На рис. 8 показана кальциевая составляющая интегрального

тока в присутствии ДГК. При начальной концентрации ДГК – 5 мкг/мл величина кальциевого тока выросла в два раза, и этот эффект наблюдался нами неоднократно. Но, при последующих добавках в 20, 80 мкг/мл кальциевый ток уменьшается и при 180 мкг/мл блокируется практически полностью.

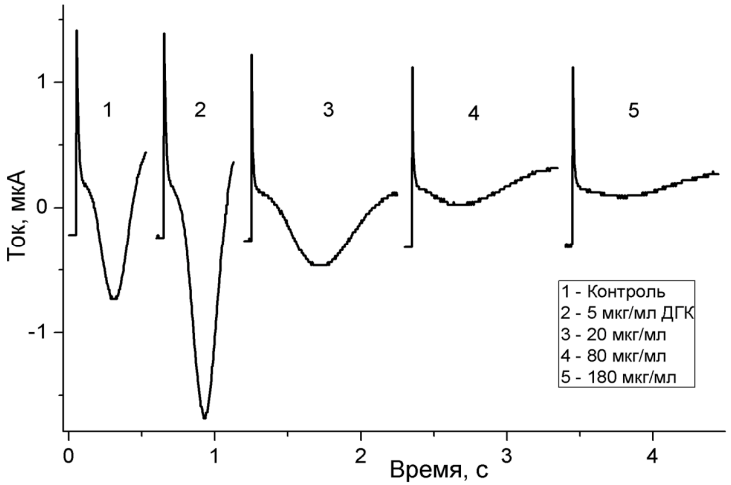


Рис. 8. Изменение характера развития кальциевого тока под действием ДГК μg/мл: 1 – контроль,2 – 5; 3 – 20; 4 – 80; 5 –180.

Обсуждение. На основании наших экспериментов мы можем сказать, что флавоноиды танин и дигидрокверцетин по своим свойствам по отношению к липидному бислою во многом совпадают. Так оба действуют через 15-30 минут после добавления в омывающий раствор. Они изменяют проводимость липидного бислоя и клеточной мембраны. Действуя на бислой, они одинаковым образом реагируют на изменение знака и величины напряжения. В липидном бислое они образуют ионные каналы, селективные для аниона Cl^-, но значительно отличаются по величине потенциала реверсии. Для танина V_r = 47 мВ, а для ДГК V_r = 25 мВ на десятикратный градиент проникающего иона. В то же время эти флавоноиды значительно отличаются по своему действию на нативную мембрану. Да, они оба блокируют Са-зависимый хлорный ток на нативной мембране водоросли, но в отличие от танина, который блокирует непосредственно хлорную компоненту Са-зависимого хлорного тока, ДГК блокирует кальциевую компоненту и вследствие этого не развивается хлорный ток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Islambekov ShYu, Mavlyanov SM, Kamaev FG, Ismailov AI. Phenolic compounds of Sumac. Chemistry of Natural Compounds // 1994. No 30. P. 37-39.
2. Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN. Exitation of Characeae cell membranes as result of activation of calcium and chloride channels // J. Membr. Biol. 1983. No 72. P. 43-58.
http://link.springer.com/article/10.1007/BF01870313
3. Berestovsky GN, Kataev AA. Voltage-gated calcium and Ca^{2+}-activated chloride channels and Ca^{2+} transients: voltage-clamp studies of perfused and intact cells of Chara // Eur. Biophys. J. 2005. No 34. P. 973-986.
4. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system // Nature. 1962. No 194. P. 979-980.
5. Borisova MP, Kataev AA, Sivozhelezov VS. Action of tannin on cellular membranes: Novel insights from concerted studies on lipid bilayers and native cells. BBA-Biomembranes 1861 (2019): 1103-1111.

ИММУНОДЕПРЕССАНТ YM-58483 ПОДАВЛЯЕТ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ

Миленина Л.С.[1], Крутецкая З.И.[1], Антонов В.Г.[2], Крутецкая Н.И.[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Фармакологические аналоги окисленного глутатиона глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, ФАРМА-ВАМ) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [1,2]. 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 [3].

Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания. Ранее [4,5] нами впервые было показано, что глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+}-депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс.

Депозависимый, или «емкостной» вход Ca^{2+}, впервые описанный Джеймсом Патни более тридцати лет назад, является универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных 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 [6,7]. Основными компонентами, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа Ca^{2+}, являются Ca^{2+}-каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+}-сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+}-депо [8]. При опустошении Ca^{2+}-депо, STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депозависимый вход Ca^{2+} [8,9].

После обнаружения важной роли депозависимых 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 [10,11], возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов депозависимых Ca^{2+}-каналов.

К числу фармакологических модуляторов депозависимого входа Ca^{2+} относятся производные бис(трифторметил)пиразолов (BTPs). Наиболее изученным из производных пиразола является иммунодепрессант YM-58483 (3,5-бис(трифторметил)пиразол, известный также как BTP2 или Pyr2). Показано, что в низкой концентрации (мкМ или нМ) YM-58483 эффективно ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} в разных клетках [12,13].

Учитывая важную роль депозависимых Ca^{2+}-каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+}, вызываемый иммуномодуляторами глутоксимом 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 $[Ca^{2+}]_i$ на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [14]. 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 рисунке 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 $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [15].

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 92 ± 16, до 136 ± 21 нМ ($n = 7$; $p \leq 0.05$) для глутоксима и 124 ± 20 нМ ($n = 6$; $p \leq 0.05$) 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 270 ± 32 и 295 ± 33 нМ ($n = 7$; $p \leq 0.05$) для глутоксима и моликсана соответственно.

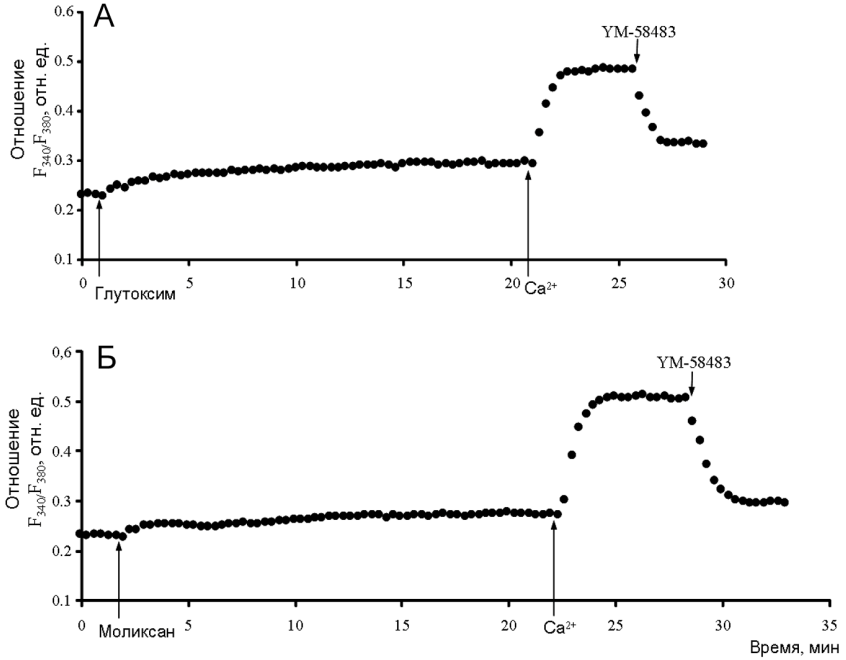


Рис. 1. Влияние YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+}, вызываемый глутоксимом или моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, 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 5 мкМ YM-58483.

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 5 мкМ YM-58483 на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+}, вызываемого глутоксимом или моликсаном, наблюдается практически полное подавление депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 1). Так, при добавлении 5 мкМ YM-58483 на фоне входа Ca^{2+}, индуцированного 100 мкг/мл глутоксима, подавление депозависимого входа Ca^{2+} составило 81.2 ± 16.1% (n = 7; $p \leq 0.05$) (рис. 1А). При добавлении 5 мкМ YM-58483 на фоне входа Ca^{2+}, индуцированного 100 мкг/мл моликсана, подавление входа Ca^{2+} составило 90.0 ± 15.3% (n = 7; $p \leq 0.05$) (рис. 1Б). Это дополнительно подтверждает, что вход Ca^{2+}, вызываемый глутоксимом или моликсаном, происходит по депозависимому механизму.

Обсуждение. Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными в литературе. Так, обнаружено, что YM-58483 подавляет уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+}, индуцируемый тапсигаргином в Т-лимфоцитах человека [16] и эндотелиальных клетках проксимальных тубул линии НК-2 почки человека [17], а также ингибирует развившийся вход Ca^{2+}, вызываемый тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в нейронах дорзальных корешков спинного мозга мыши [18].

Механизм влияния YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+} до конца не изучен. Учитывая, что мультибелковый комплекс депозависимого входа Ca^{2+} включает по меньшей мере два компонента – белки STIM1 и Orai1, фармакологические агенты могут регулировать депозависимый вход Ca^{2+}, воздействуя на любой из этих белков. Так, YM-58483 может модулировать депозависимый вход Ca^{2+}, воздействуя на Ca^{2+}-сенсор STIM1, может прямо блокировать пору Orai1-каналов, или влиять на взаимодействие белков STIM1 и Orai1. Методом конфокальной микроскопии на клетках эмбриональной почки HEK293 обнаружено, что YM-58483 не влияет на кластеризацию белков STIM1 или кластеризацию белков Orai1 [19,20]. С использованием метода пэтч-клэмп показано, что YM-58483 ингибирует депозависимые Ca^{2+}-каналы при приложении только к наружной поверхности Т-клеток линии Jurkat человека [21]. В связи с этим полагают, что YM-58483 может ингибировать депозависимый вход Ca^{2+}, прямо взаимодействуя с белками Orai1 [20-23].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что, как и для клеток других типов, YM-58483 является удобным фармакологическим инструментом для изучения депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах и перспективным агентом для фармакологических исследований не только как иммунодепрессант, но и как препарат для лечения заболеваний, связанных с нарушением механизмов депозависимого входа Ca^{2+}.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов АЕ, Кожемякин ЛА, Антушевич АЕ, Кетлицкая ОС, Кащенко ВА, Чепур СВ, Кацалуха ВВ, Васюкова ЕЛ, Новиченков АО, Мотущук ИЕ. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов группы тиопоэтинов при циррозе печени. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова.* 2001; 4(2): 32-38.
2. Толстой ОА, Цыган ВН, Климов АГ, Степанов АВ, Антушевич АЕ. Экспериментальная оценка эффективности препарата моликсан по восстановлению работоспособности вирусинфицированных лабораторных животных. *Известия Рос. Военно-мед. акад.* 2019; 38(1): 271-277.
3. Dubina MV, Gomonova VV, Taraskina AE, Vasilyeva NV, Sayganov SA. Pathogenesis-based pre-exposure prophylaxis associated with low risk of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a designated COVID-19 hospital: a pilot study. *BMC Infect. Dis*. 2021; 21(1): 536. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06241-1
4. Курилова ЛС, Крутецкая ЗИ, Лебедев ОЕ, Антонов ВГ. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Цитология.* 2008; 50(5): 452–461.
5. Курилова ЛС, Крутецкая ЗИ, Лебедев ОЕ, Крутецкая НИ, Антонов ВГ. Влияние препарата моликсан на процессы Ca^{2+}-сигнализации в макрофагах. *Цитология.* 2011; 53(9): 708.
6. Putney JW. Store-operated calcium entry: an historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 981: 205-214.
7. Putney JW. The physiological function of store-operated calcium entry. *Neurochem. Res.* 2011; 36: 1157–1165.
8. Rubaiy HN. ORAI calcium channels: regulation, function, pharmacology, and therapeutic targets. *Pharmaceuticals.* 2023; 16: 162. https://doi.org/10.3390/ph16020162
9. Lunz V, Romanin C, Frischauf I. STIM1 activation of Orai1. *Cell Calcium.* 2019; 77: 29-38.
10. Lacruz RS, Feske St. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015; 1356: 45-79.
11. Feske St. CRAC channels and disease – from human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. *Cell Calcium.* 2019; 80: 112-116.
12. Putney JW. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol. Interv.* 2010; 10: 209-218.
13. Bird GS, Putney JW. Pharmacology of store-operated calcium entry channels. In: *Calcium entry channels in non-excitable cells.* Kozak JA, Putney JW, editors. CRC Press. 2018; 343 p. 311-324.
14. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 3440–3450.
15. Xie Q, Zhang Y, Zhai C, Bonanno JA. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 16559-16566.

16. Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T, Takezawa R, Ichikawa A, Kubota H, Yamada T. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J. Immunol.* 2003; 170: 4441-4449.
17. Zeng B, Chen GL, Garcia-Vaz E, Bhandari S, Daskoulidou N, Berglund LM, Jiang H, Hallett T, Zhou LP, Huang L, Xu ZH, Nair V, Nelson RG, Ju W, Kretzler M, Atkin SL, Gomez MF, Xu ShZ. ORAI channels are critical for receptor-mediated endocytosis of albumin. *Nat. Commun.* 2017; 8: 1920. DOI: 10.1038/s41467-017-02094-y
18. Xia J, Pan R, Gao X, Meucci O, Hu H. Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis. *J. Physiol.* 2014; 592.16: 3443-3461.
19. Sadaghiani AM, Lee SM, Odegaard JI, Leveson-Gower DB, McPherson OM, Novick P, Kim MR, Koehler AN, Negrin R, Dolmetsch RE, Park ChY. Identification of Orai1 channel inhibitors by using minimal functional domains to screen small molecule microarrays. *Chem. Biol.* 2014; 21: 1278-1292.
20. Rahman S, Rahman T. Unveiling some FDA-approved drugs as inhibitors of the store-operated Ca^{2+} entry pathway. *Sci. Rep.* 2017; 7: 12881. DOI: 10.1038/s41598-017-13343-x
21. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M. Potent inhibition of Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 12427–12437.
22. Derler I, Schindl R, Fritsch R, Heftberger P, Riedl MCh, Begg M, House D, Romanin Ch. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium*. 2013; 53: 139-151.
23. Jairaman A, Prakriya M. Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels. *Channels*. 2013; 7: 402-414.

IP_3-ЗАВИСИМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ИЗ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В АСТРОЦИТАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Погонялова М.Ю.[1], Ератова Л.В.[1], Винокуров А.Ю.[1], Абрамов А.Ю.[1,2]

[1]Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия
[2]UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

Введение. Синглетный кислород ($^1O_2$) — это молекулярный кислород в возбужденном состоянии с высокой энергией и электрофильными свойствами [1]. $^1O_2$ может образовываться при различных процессах, таких как интенсивное окисление, активированное гидроксильными радикалами [2], ферментативной продукцией [3,4], фотокатализом [5] и фотосенсибилизацией [6]. Также на сегодняшний день существует возможность прямой фотоактивации молекулярного кислорода: благодаря высокому коэффициенту абсорбции при 1262-1268 нм образование $^1O_2$ возможно при облучении лазером с длиной волны ~1267 нм, что в настоящее время находит применение для направленного воздействия на биологические процессы[7]. Влияние $^1O_2$ на живые системы неоднозначно: известно, что в высоких дозах он может обладать цитотоксическим эффектом [8] и индуцировать апоптоз в тканях [9], но при этом он может играть роль активатора физиологических процессов в клетках [7].

Производство активных форм кислорода (АФК), в том числе $^1O_2$, часто сопровождается перекисным окислением липидов (ПОЛ), что может является частью сигнального механизма в ответ на внешнее возбуждение нейронов и астроцитов. Можно предположить, что наряду с другими АФК $^1O_2$ регулирует гомеостаз кальция в клетке [10]. Кальций, как один из регуляторов клеточного метаболизма [11], может высвобождаться внутри клетки, проникать напрямую или активировать мембранные рецепторы, запуская сигнальные пути [12]. Точный механизм такой регуляции до сих пор остается не изученным, в связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния $^1O_2$, полученным с помощью прямой генерации на длине волны 1267 нм, на внутриклеточный кальциевый гомеостаз в клетках нейрон-глиальной культуры.

Материалы и методы. Первичную нейрон-глиальную культуру коры головного мозга получали от крысят линии Wistar по стандартной методике [13]. Эксперименты по измерению концентрации кальция проводили с помощью ратиометрического зонда Fura-2 AM (5 мкМ) на

широкопольном флуоресцентном микроскопе с флюоритовым иммерсионным объективом x20 с использованием возбуждающего излучения с длинами волн 340 и 380 нм. Измерения флуоресценции зондов Hoechst 33342, Propidium Iodide, C-11 BODIPY 581/591 проводились с помощью конфокального микроскопа LSM 900. Для оценки уровня некроза использовались (5 мкМ) Hoechst 33342 и (5 мкМ) Propidium Iodide. Клетки инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Гибель клеток измеряли через 24 ч после обработки клеток лазером. Для оценки перекисного окисления липидов C11-BODIPY 581/591 (2 мкМ) загружаем в течение 30 минут при 37°C и затем отмываем 3 раза HBSS. C11-BODIPY возбуждался с помощью лазера с длиной волны 488 и 565 нм, а флуоресценция измерялась в диапазоне от 505 до 550 нм и выше 580 нм.

Эксперименты *in vivo* проводили мышах линии CD-1. Животное анестезировали при помощи дыхательного наркоза, затем его закрепляли в установке для стереотаксиса и проводили подготовку операционной области, после чего на черепе закрепляли специальную установку для поддержания температуры и влажности головного мозга. После проводилось снятие в исследуемой области части черепной коробки. Во время эксперимента эта область находилась в растворе HBSS. Исследования соответствуют этическим нормам по гуманному обращению с животными и входят в манипуляции, одобренные Этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 2 от 06.12.2024). Канал визуализации изменений в церебральном кровотоке был реализован с использованием источников некогерентного (525 нм) света для зондирования биологической ткани, расположенными вокруг объектива, чтобы достичь максимальной равномерности освещения, образуя тем самым кольцевой осветитель. Интенсивность излучения осветителя регулировалась с помощью пультов управления.

Статистический анализ полученных данных по критерию Манна-Уитни и построение графиков для представления результатов проводили с использованием программного обеспечения Origin 2018.

Результаты. При облучении клеток лазером с длиной волны 1267 нм наблюдается снижение амплитуды кальциевого ответа на АТФ в астроцитах (рис. 1Г), при этом во время самого облучения в некоторых клетках наблюдается спонтанный кальциевый ответ (рис. 1Б,В). Так, в клетках после облучения с дозами 180 Дж/см^2 и 300 Дж/см^2 амплитуда кальциевого ответа снижается по сравнению с контролем.

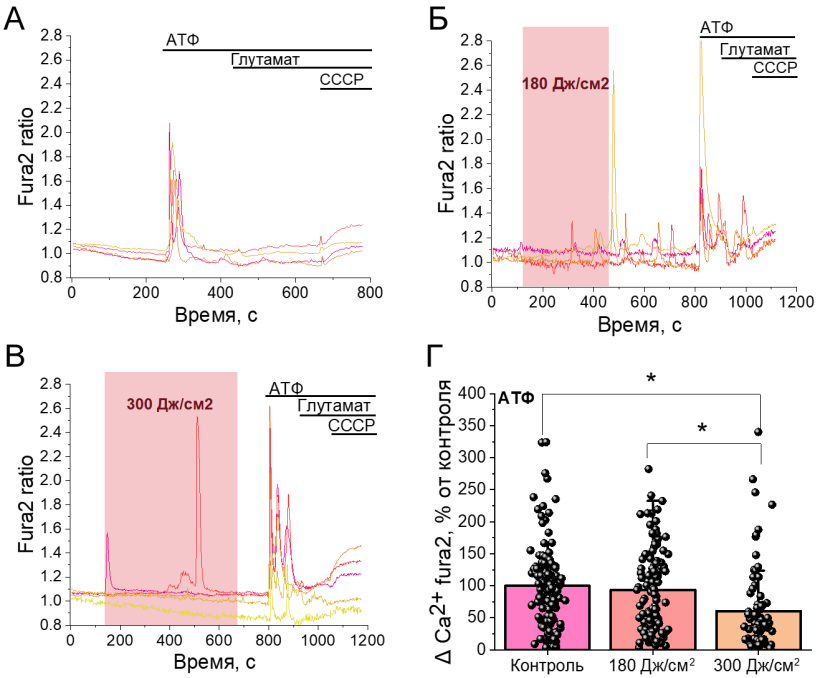


Рис. 1. Синглетный кислород вызывает кальциевый сигнал в клетках мозга. Репрезентативные графики (А-В) А – контроль, Б – облучение дозой 180 Дж/см^2, В – облучение дозой 300 Дж/см^2, Г – амплитуда кальциевого ответа на АТФ.

Для того, чтобы оценить, за счет чего происходит снижение концентрации кальция в цитозоле, были проведены эксперименты на бескальциевой среде с тапсигаргином – ингибитором кальциевой АТФ-азы (SERCA), которая находится на эндоплазматическом ретикулуме. Тапсигаргин повышает цитозольную концентрацию кальция, блокируя способность клетки перекачивать кальций в саркоплазматическую и эндоплазматическую сети. Показано, что облучение с дозой 180 Дж/см^2 приводит к снижению кальция в ЭПР, при дозе 300 Дж/см^2 ответа на тапсигаргин не наблюдается совсем (рис. 2А). В этом же эксперименте мы вносили ионофор, иономицин, который переносит ионы кальция. Амплитуда ответа на иономицин после облучения дозой 180 Дж/см^2 статистически значимо увеличивается, что может говорить о том, что концентрация кальция увеличивается в других органеллах, но при дозе 300 Дж/см^2 такого эффекта не наблюдается – амплитуда кальциевого ответа составляет (рис. 2Б).

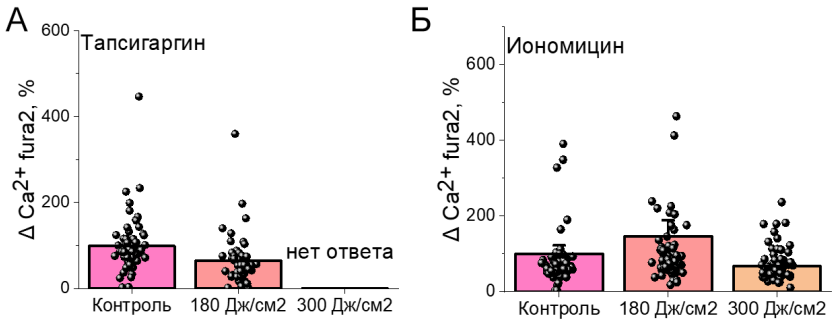


Рис. 2. Концентрация кальция изменяется в клеточных компартментах под воздействием синглетного кислорода. А – амплитуда кальциевого ответа на тапсигаргин, Б – амплитуда кальциевого ответа на иономицин.

Как уже было сказано ранее, $^1O_2$ может приводить к ПОЛ. В экспериментах с BODIPYY облучение лазером выступало причиной увеличения скорости ПОЛ в небольшом проценте клеток, при этом обработка клеток антиоксидантами снижало данный параметр, возвращая значения к контрольным (рис. 3), а также убирало эффект лазера на кальциевый гомеостаз.

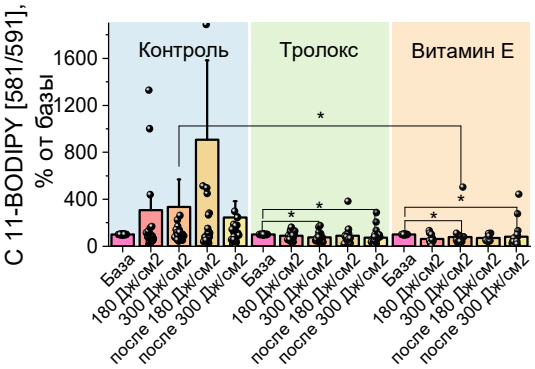


Рис. 3. Облучение лазером приводит к увеличению скорости ПОЛ. Скорость ПОЛ в необработанных клетках, а также в клетках, обработанных антиоксидантами.

Для того, чтобы выяснить механизм появления кальциевого сигнала во время облучения лазером, были проведены эксперименты с ингибиторами фосфолипазы С (U73122), пуринорецепторов (Сурамин), а также опосредованной с G-белком передачи сигналов (PPADS). Использование каждого ингибитора приводило к полному отсутствию кальциевых сигналов в ответ на облучение. При этом использование лазера с длиной волны 1267 нм и различных доз облучения не приводило к гибели клеток. При облучении дозами 180 Дж/см^2 и 300 Дж/см^2 уровень клеточной смерти не превышает контрольные значения. С дозой выше физиологических, 450 Дж/см^2, происходит увеличения доли некротических клеток, но статистически не значимое.

Более того, связанное с облучением изменение кальциевого гомеостаза может играть физиологическую роль. В экспериментах *in vivo* при обеих дозах облучения наблюдается тенденция к расширению сосудов головного мозга как во время облучения, так и после него. Но при внесении ингибитора пуринорецепторов изменения в просвете кровеносных сосудов больше не наблюдаются, что может свидетельствовать о том, что эти изменения связаны именно с сигнальными путями кальция, активируемыми под действием $^1O_2$ (рис. 4А,Б).

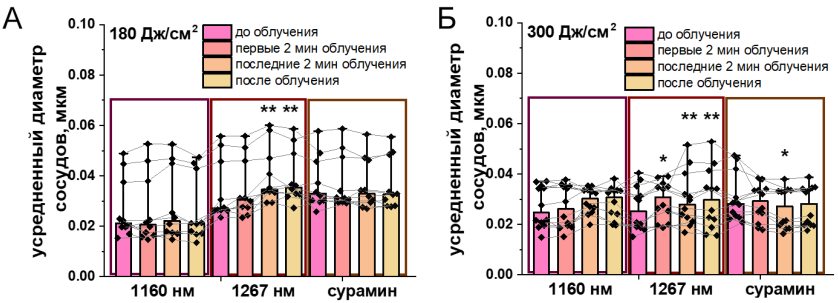


Рис. 4. Облучение приводит к расширению кровеносных сосудов в мозге. А – изменение диаметра кровеносных сосудов в мозге мыши с дозой облучения 180 Дж/см^2, Б – изменение диаметра кровеносных сосудов в мозге мыши с дозой облучения 300 Дж/см^2.

Заключение. Лазерное облучение с длиной волны 1267 нм, приводящее к образованию $^1O_2$, вызывает кальциевый сигнал в астроцитах за счет высвобождения Ca2+из ЭПР. Лазерное облучение запускает кальциевые сигналы через активацию пуринергического сигнального пути, который включает активацию пуринорецепторов, передачу сигналов через G-белки и активацию фосфолипазы С. $^1O_2$ также вызывает

увеличение скорости ПОЛ, но в небольшом проценте клеток, что также может оказывать влияние на кальциевый гомеостаз, вероятно, через модификацию сигнальных путей. Обработка клеток антиоксидантами эффективно снижает уровень ПОЛ и устраняет связанные с ним изменения в кальциевом гомеостазе. При облучении лазером запускаются физиологические механизмы, приводящие к расширению кровеносных сосудов в головном мозге. Эти изменения связаны именно с сигнальными путями кальция, активируемыми под действием $^1O_2$.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2025-011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang Y. et al. Singlet oxygen: Properties, generation, detection, and environmental applications // Journal of hazardous materials. Elsevier, 2024. Vol. 461. P. 132538.
2. Wu S. et al. Catalytic activity and reaction mechanisms of single-atom metals anchored on nitrogen-doped carbons for peroxymonosulfate activation // Journal of Hazardous Materials. Elsevier, 2023. Vol. 459. P. 132133.
3. Kanofsky J.R. Singlet oxygen production by lactoperoxidase: halide dependence and quantitation of yield // Journal of Photochemistry. Elsevier, 1984. Vol. 25, № 2–4. P. 105–113.
4. Miyamoto S. et al. Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides // J Photochem Photobiol B. 2014. Vol. 139.
5. Nosaka Y., Nosaka A.Y. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis // Chemical Reviews. 2017. Vol. 117, № 17.
6. Wilson B.C., Patterson M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // Physics in Medicine & Biology. IOP Publishing, 2008. Vol. 53, № 9. P. R61.
7. Sokolovski S.G. et al. Singlet oxygen stimulates mitochondrial bioenergetics in brain cells // Free Radical Biology and Medicine. Elsevier, 2021. Vol. 163. P. 306–313.
8. Sokolovski S.G. et al. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells // Scientific reports. Nature Publishing Group UK London, 2013. Vol. 3, № 1. P. 3484.
9. Novikova I.N. et al. Laser-induced singlet oxygen selectively triggers oscillatory mitochondrial permeability transition and apoptosis in melanoma cell lines // Life sciences. Elsevier, 2022. Vol. 304. P. 120720.
10. Richter C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca 2+ homeostasis and respiration // Bioscience Reports. Springer, 1997. Vol. 17. P. 53–66.
11. Richter C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca2+ homeostasis and respiration // Bioscience Reports. 1997. Vol. 17, № 1.
12. Brini M. et al. Intracellular calcium homeostasis and signaling // Metallomics and the Cell. Springer, 2013. P. 119–168.
13. Vinokurov A.Y. et al. Energy substrate supplementation increases ATP levels and is protective to PD neurons // Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. Elsevier, 2024. Vol. 6. P. 100187.

АНАЛИЗ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ КЛЕТОК HEK-293 НА АЦЕТИЛХОЛИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАЗОВЫХ ТРАЕКТОРИЙ

Соколов В.В., Каймачников Н.П., Рогачевская О.А., Кабанова Н.В., Колесников С.С.

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

Введение. Кальциевая сигнализация основана на перераспределении Ca^{2+} между внутриклеточными компартментами в сочетании со входом и выбросом Ca^{2+} через плазматическую мембрану. При действии агонистов, стимулирующих фосфолипазу С, образуется мессенджер инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP_3), который приводит к открыванию IP_3-рецепторов/каналов эндоплазматического ретикулума (ЭР) и выходу в цитозоль Ca^{2+}, запасаемого ретикулярной Ca^{2+}-АТРазой. Эти рецепторы также стимулируются при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} (C), что лежит в основе явления Ca^{2+}-индуцируемого высвобождения депонированного Ca^{2+}, результатом которого являются многообразные формы кальциевых ответов, включая продолжительные колебания [1].

Концентрация Ca^{2+} в ЭР (C_s) достигает в покое сотен мкМ и меняется в ходе ответов на стимулы. Она является важной переменной, будучи детерминантом трансмембранного градиента и аллостерическим регулятором потока Ca^{2+} через IP_3-рецептор [2]. Кроме того, ретикулярный Ca^{2+} определяет скорость поступления Ca^{2+} в клетку через депо-регулируемый вход Ca^{2+} [3]. Мониторинг этой концентрации в нативных клетках осложняется тем, что даже низкоаффинные флуоресцентные индикаторы частично отражают изменения C. От этого недостатка свободны генетически-кодируемые Ca^{2+} сенсоры с локализацией в ЭР, например, R-CEPIA1er [4,5]. Одновременные изменения C и C_s в ответ на кратковременные аппликации агониста в целом верно описываются математической моделью, учитывающей один пул запасенного Ca^{2+}, в которой предсказана форма соответствующей траектории на фазовой плоскости [5].

Внутриклеточные запасы Ca^{2+} имеют сложную морфологическую структуру. ЭР состоит из трех основных областей – гладкий ЭР, шероховатый ЭР и ядерная оболочка, которые представляют собой непрерывную мембранную сеть. К мембранам ЭР тесно прилегают другие

органеллы – лизосомы и митохондрии, которые поглощают Ca^{2+} и участвуют в формировании сигнала [6,7]. Значительные количества Ca^{2+} содержатся в аппарате Гольджи, а также в эндосомальных везикулах, обеспечивающих трафик веществ между клеточной мембраной и органеллами [6,8].

В настоящей работе мы провели детальный анализ кинетики параллельных изменений C и C_s в клетках HEK-293. С помощью фазовой плоскости установлено, что поведение этих концентраций на переднем фронте сигнала включает их совместный рост, не объясняемый входом Ca^{2+} в клетку и, вероятно, вызываемый участием дополнительного пула запасенного Ca^{2+}.

Методы. В работе использовались клетки моноклональной линии HEK-293 с постоянной экспрессией в ЭР флуоресцентного белка-сенсора R-CEPIA1er, которые культивировались по стандартному протоколу [5]. Перед экспериментом клетки помещали в фотометрическую камеру и загружали Ca^{2+}-зондом Fura-2 в физиологической (нормальной) среде следующего состава (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 глюкозы, pH 7.4. Для получения среды с низким Ca^{2+}, 2 мМ Ca^{2+} заменялись на 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ Ca^{2+} (260 nM свободного Ca^{2+}). Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200, оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75, цифровой EMCCD камерой iXon888 (Andor Technology) и фильтром Chroma 59022. Флуоресценцию Ca^{2+}-индикаторов поочередно возбуждали на длинах волн 340 ± 5 нм, 380 ± 5 нм и 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в областях 520 ± 20 нм и 630 ± 30 нм для Fura-2 и R-CEPIA1er, соответственно. Изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле и ЭР оценивали по относительному изменению интенсивностей флуоресценции $F_c=F_{340}/F_{380}$ для Fura-2 и $F_s=\Delta F/F_0$ 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). На фазовой плоскости откладывались нормированные значения флуоресценции $F_{s,n}$ и $F_{c,n}$, равные модулю отклонения, соответственно, F_s и F_c от максимального или минимального значения, деленному на амплитуду максимального отклонения.

Результаты и обсуждение. Многочисленные данные свидетельствуют о гетерогенности формы ответов внутриклеточного Ca^{2+} на агонист в одной и той же популяции клеток, в частности, клеток HEK-

293 [9]. При этом одновременное поведение C и C_s, которое может дать ключ к пониманию механизмов такого разнообразия, изучено недостаточно. Мы отследили это поведение при продолжительной стимуляции клеток ацетилхолином (АХ), агонистом G-белок-сопряженных рецепторов, стимулирующих фосфолипазу С. Как видно из рис. 1, после начала стимуляции посредством АХ, цитозольный Ca^{2+} имел острый пик и последующее более медленное опускание с возможными наложенными «дрейфующими» [10] колебаниями. Этому соответствовало (нижние кривые на рис. 1А,Б) быстрое частичное снижение C_s, промежуточное повышение в виде зубца и дальнейшее снижение, плавно или с колебаниями, до основного минимума. Далее в большинстве случаев (88% клеток), несмотря на продолжающееся присутствие стимула, происходил одновременный спонтанный срыв обеих концентраций по направлению к базальным значениям, которые достигались монотонно до практически полного восстановления (рис. 1А) или с дополнительными низкоамплитудными выбросами Ca^{2+}. В некоторых клетках (6% клеток) этот срыв отсутствовал, и до конца стимуляции сохранялись достигнутые уровни. Иногда (6% клеток), дрейфующие колебания переходили в колебания большой амплитуды, как на панели рис. 1Б. Подобные типы поведения C в клетках HEK-293 сообщались ранее при стимуляции карбахолом [9], но без измерения C_s.

Для того, чтобы более точно очертить взаимосвязь C и C_s, мы использовали представление измеряемой флуоресценции в цитозоле и ЭР (соответственно, F_c и F_s) в виде фазовой траектории на плоскости нормированных величин ($F_{s,n}$, $F_{c,n}$), как показано на соответствующих нижних панелях рис. 1В,Г. Такое представление лежит в основе качественной теории динамических систем на плоскости [11], где фазовые траектории не могут пересекаться в силу единственности решения. Оказалось, что начальная часть траектории при различных типах длительного ответа в значительном числе случаев имеет самопересечение и образует петлю (рис. 1В,Г), в отличие от формы траектории без такой особенности (вставка на рис. 1В), которая подобна теоретической кривой [5]. Это означает, что экспериментальная система содержит более двух существенных переменных, определяющих рассматриваемую здесь динамику. Наличие петли связано с ростом полной измеряемой концентрации Ca^{2+}, в чем можно убедиться путем пересечения петли произвольной горизонтальной прямой $C=const$, которая дает две точки, демонстрирующие повышение C_s в точке с более поздним временем и увеличение $C+C_s$. Топологически такая же петля имела место при аппликации 1 мкМ карбахола, что указывает на ее происхождение в результате активации фосфоинозитидного сигнального каскада независимо от конкретного агониста.

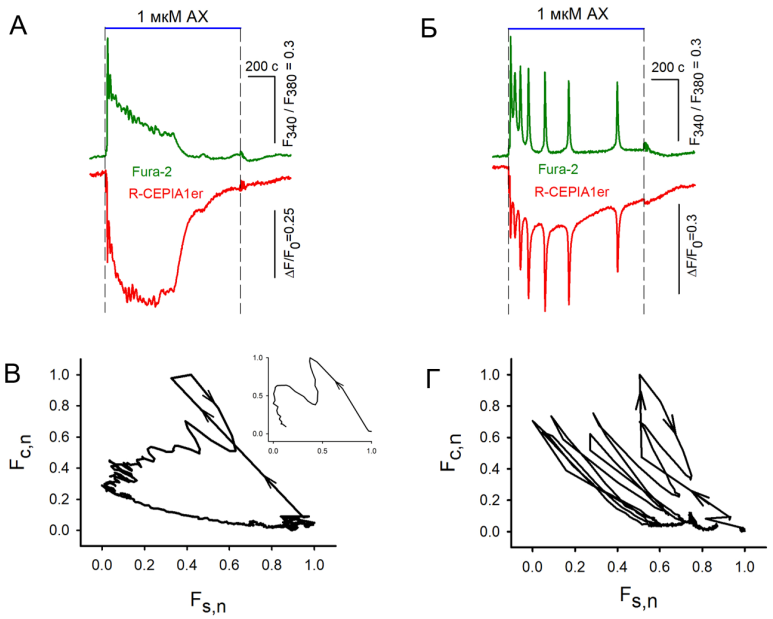


Рис. 1. Два типа одновременных ответов F_c и F_s на добавление 1 мкМ АХ (горизонтальные сплошные линии). В нижнем ряду данные соответствующих клеток верхнего ряда за время действия АХ построены на фазовой плоскости нормированных величин, стрелки указывают направления движения. А, В – спонтанный срыв концентраций к состоянию покоя (88% клеток), Б, Г – возникновение колебаний большой амплитуды от базального уровня (6% клеток). *N*=84. Вставка на В – пример формы трактории за 60 с без петли.

Чтобы установить роль входа Ca^{2+} в клетку, была проделана стимуляция клеток в нормальной среде и после ее замены на среду с 260 нМ Ca^{2+} (рис. 2). Запись во времени на рис. 2А показывает в целом такой же характер ответа F_c и F_s при 260 нМ Ca^{2+}, что и в контроле. Наложенные колебания, присущие этой клетке, сохраняются. Соответствующие фазовые траектории до и после удаления Ca^{2+} из среды (рис. 2Б) также подобны друг другу и имеют петлю. В данных по 5 независимым экспериментам (рис. 3) отчетливая петля фазовой траектории была в 30.9% клеток в нормальной среде и даже в несколько большем числе клеток 31.4% при 260 нМ Ca^{2+}. Это различие не является статистически значимым (P = 0.937). Петля могла отсутствовать при стимуляции в нормальной среде и появляться в низкокальциевой среде, но в преобладающем числе клеток с петлей она наблюдалась в обоих случаях, оставляя лишь небольшую (около 20%) долю клеток, не способных генерировать петлю при этих двух испытаниях. Так как при 260 нМ

внеклеточного Ca^{2+} вход Ca^{2+} через плазматическую мембрану пренебрежимо мал, то полученные данные говорят о том, что начальная кинетика C и C_s с петлей траектории за использованное время 90 с практически полностью определяется внутриклеточными событиями без вклада модуляции потока входящего Ca^{2+}. Этой подсистеме внутренне присущ обнаруженный эффект петли, хотя его проявление вариабельно, возможно, из-за большой его чувствительности к начальным условиям на момент презентации стимула.

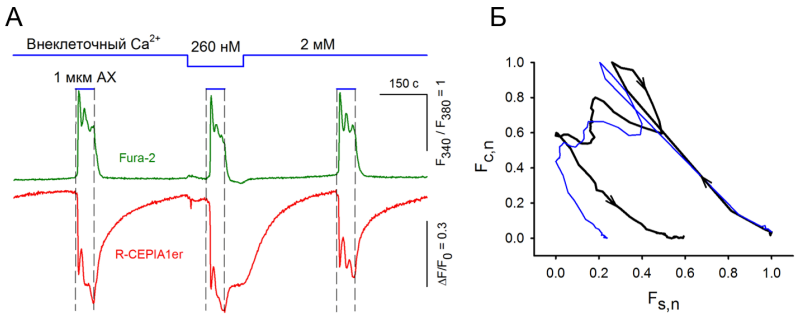


Рис. 2. Сохранение петли фазовой траектории в низкокальциевой среде**.** Представлена репрезентативная запись для одной клетки из N=429. А – 90-секундные добавки 1 мкМ АХ в нормальной среде и после ее замены на среду с 260 нМ Ca^{2+}. Б – Траектория за 100 с первой (черная толстая линия) и второй (синяя тонкая линия) стимуляции из панели А. Медленный тренд снижения флуоресценции сенсора R-CEPIA1er корректировался по формуле из работы [5], учитывающей его фотодеструкцию.

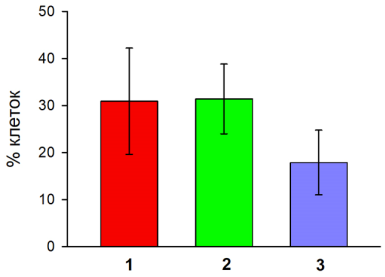


Рис. 3. Диаграмма наличия петли фазовой траектории в нормальной и низкокальциевой среде. 1 – клетки (30.9±11.3 %, mean ± SD) с петлей при 2 мМ Ca^{2+} во внеклеточной среде; 2 – клетки (31.4±7.4 %) с петлей при 260 нМ Ca^{2+}, P = 0.937 относительно нормальной среды 1; 3 – клетки (17.9±6.9%) с петлей и при 2 мМ, и при 260 нМ Ca^{2+}. N=429 в 5 экспериментах.

Помимо мобилизации Ca^{2+} из ЭР через IP_3-рецептор и входа из среды, в формировании Ca^{2+}-сигнала могли бы существенным образом участвовать другие внутриклеточные источники Ca^{2+}. Возможный вклад некоторых из них мы протестировали с использованием ингибиторов, которые затрагивают: кислотные запасы, содержащие двухпоровые каналы (50 мкМ trans-Ned 19), аппарат Гольджи и везикулы, закачивающие Ca^{2+} через АТР-азу SPCA (1 мкМ Bis-phenol), органеллы, высвобождающие Ca^{2+} через рианодиновые рецепторы (30 мкМ Ryanodine), и митохондрии, удаляющие Ca^{2+} из матрикса в цитозоль через Na^+/Ca^{2+}-обменник (20 мкМ CGP 37157). Как видно из табл. 1, ни один из этих ингибиторов не устранял наличие петли фазовой траектории, и доля клеток с петлей менялась лишь незначительно относительно контроля. Таким образом, перечисленные потоки и органеллы исключены в качестве причин обнаруженного эффекта.

Табл. 1. Доля клеток (%) с петлей фазовой траектории.

Ингибитор	**Контроль**	**С ингибитором**	***N***
trans-Ned 19	20.7	21.7	92
Bis-phenol	16.3	14.0	86
Ryanodine	20.6	21.6	194
CGP 37157	22.6	21.1	133

Мы предполагаем, что дополнительный пул Ca^{2+} может быть локализован в относительно обособленной области ЭР, которая дает приток Ca^{2+} в первоначально быстро мобилизуемый пул с некоторой задержкой, делая возможным формирование пика C на участке роста C_s. Снижение Ca^{2+} во втором пуле, вероятно, существенно не противодействует росту флуоресценции R-CEPIA1er, так как этот пул недоступен для данного сенсора или имеет сравнительно малый объем. Участие дополнительного Ca^{2+}-запаса в клетках HEK-293 поддерживается данными о функциональной и, возможно, морфологической компартментализации при действии только IP_3 и в сочетании IP_3 с cAMP [12]. Более точная идентификация двух субкомпартментов кальциевого депо и установление механизма их взаимодействия требуют дальнейших исследований, в которых важную роль может сыграть математическое моделирование.

Работа выполнена в рамках ГЗ 1024032700125-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berridge M.J. // Physiol. Rev. 2016. 96: 1261-96.
2. Vais H., Wang M., Mallilankaraman K. et al. // Elife 2020. 9: e53531.
3. Kodakandla G., Akimzhanov A.M., Boehning D. // Front. Physiol. 2023. 14: 1330259.
4. Suzuki J., Kanemaru K., Ishii K. et al. // Nat. Commun. 2014. 5: 4153.
5. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N. et al. // Biochim. Biophys. Acta 2021. 1: 100012.
6. Zampese E., Pizzo P. // Cell. Mol. Life Sci. 2012. 69: 1077–104.
7. Lam A.K., Galione A. // Biochim. Biophys. Acta 2013. 1833: 2542-59.
8. Galione A., Davis L.C., Martucci L.L. et al // Handb. Exp. Pharmacol. 2023. 278: 3-34.
9. Jing X., Chen L., Ren S., Luo D. // Cytotechnology 2011. 63: 81-8.
10. Туровский Е.А., Каймачников Н.П., Туровская М.В. и др. // Биологические мембраны 2011. 28: 463–72.
11. Андронов А.А., Леонтович Е.А., Гордон И.И. и др. Качественная теория динамических систем второго порядка. 1966. М.: Наука. 568 с.
12. Konieczny V., Tovey S.C., Mataragka S. et al. // Cell Rep. 2017. 18: 711-722.

ИЗУЧЕНИЕ ВЫБОРА ПУТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

Сулягина В.П.[1], Косарева Р.С.[1], Калинин А.Ю.[1], Бондарев А.Д.[1], Щербакова Л.Н.[2], Чечехина Е.С.[1], Чечехин В.И.[1], Тюрин-Кузьмин П.А.[1]

[1]Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Университетская клиника МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В настоящее время активно развивается регенеративная медицина – область медицины, направленная на восстановление повреждённых тканей и органов путём активации собственных регенеративных процессов организма, в первую очередь, стволовых клеток. Кроме того, используются подходы с трансплантацией клеток. Классическая медицина традиционно ориентирована на купирование симптомов и поддержание жизнеспособности пациента. Она основывается на медикаментозном лечении, хирургических вмешательствах и реабилитации. В отличие от неё, регенеративная медицина стремится восстановить утраченные функции тканей и органов путём управления регенеративными процессами, используя механизмы естественного обновления тканей, либо замещая дефектные клетки новыми, функционально полноценными [1].

Становление регенеративной медицины началось ещё в 1902 году, когда А.А. Максимов сформулировал унитарную теорию кроветворения, согласно которой все клетки крови развиваются из одного предшественника – стволовой клетки крови. Спустя 50 лет его работу продолжил другой выдающийся российский учёный А.Я. Фриденштейн, который исследовал гемопоэз и костную ткань, изучая её взаимодействие с кровеносной системой. В ходе своих исследований он открыл негемопоэтические клетки, которые выполняют роль окружения гемопоэтических клеток. Фриденштейн первым выделил из костного мозга адгезивные фибробластоподобные клетки, обладающие мультипотентностью и способные дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, перициты и стромальные клетки, необходимые для поддержания гемопоэза [2,3]. В дальнейшем эти клетки были названы мультипотентными мезенхимными стволовыми (или стромальными) клетками, сокращённо МСК. МСК присутствуют в различных тканях организма, где они при помощи паракринных сигнальных механизмов выполняют функцию поддержания гомеостаза и формирования стромы; в

хрящевой, костной и жировой тканях за счёт МСК происходит также обновление клеток ткани [4]. В данной работе мы сосредоточились на МСК жировой ткани человека.

Жировая ткань выполняет множество необходимых для организма функций: обеспечивает запасание питательных веществ, механическую защиту внутренних органов и осуществляет регуляторную функцию, являясь эндокринным органом. Жировую ткань можно разделить на подкожный жир, выполняющий, в первую очередь, запасающую функцию, и висцеральный жир, основной функцией которого является механическая защита внутренних органов. МСК присутствуют в обоих жировых депо, однако в подкожной жировой ткани они должны быть способны быстро дифференцироваться в адипоциты для осуществления запасающей функции, а в висцеральной жировой ткани их задачей является обновление ткани с поддержанием её объёма и функций [5]. Из-за таких функциональных различий данных жировых депо мы предположили, что и регуляция дифференцировки МСК в них также будет различаться.

Жировая ткань является высокопластичной, то есть её объём может значительно изменяться в течение жизни как в сторону увеличения, так и уменьшения объёма. Кроме того, средний срок жизни отдельных адипоцитов составляет 8-10 лет. В связи с этим, для нормального функционирования жировой ткани критически важны процессы обновления клеточного состава ткани, которые обеспечиваются МСК. Нарушение её обновления, приводящее к гипертрофии адипоцитов и их инсулинорезистентности, может стать причиной развития таких патологий как метаболический синдром, диабет 2 типа и сердечно-сосудистые заболевания [6,7]. За поддержание субпопуляционного состава жировой ткани отвечают МСК, поэтому так важно изучать, какие факторы влияют на выбор пути их дифференцировки. В жировой ткани МСК в норме дифференцируются в белые или бежевые адипоциты. Белые адипоциты запасают энергию в виде липидных капель с триглицеридами. Бежевые адипоциты, будучи похожими на теплопродуцирующие бурые адипоциты, но имеющие отличное от них происхождение, играют роль в термогенезе за счёт разобщения дыхательной цепи митохондрий при помощи белка UCP1 (термогенин).

В норме МСК дифференцируются очень медленно, обычно дифференцировку вызывают приходящие извне стимулы – гормональные сигналы. Ранее мы изучали выбор направления дифференцировки МСК и обнаружили, что на первом этапе МСК под действием внешнего стимула переходят в инициированное состояние, в котором они становятся чувствительными к последующим сигнальным воздействиям. Из этого состояния МСК могут при наличии необходимого инструктивного сигнала дифференцироваться в адипоциты, клетки костной ткани и перициты, а также вернуться в покоящееся состояние, если повторного сигнала не

последовало [8]. Как мы показали, инструктивным сигналом являются гормоны, причём важно не только то, в какой комбинации они действуют, но также последовательность их действия на МСК. Было показано, что при двух последовательных добавлениях норадреналина с интервалом от 6 до 9 часов ответ МСК оказывается сильнее по сравнению с одиночным добавлением норадреналина. При первом добавлении норадреналина через β3-адренорецепторы запускается цАМФ-зависимый сигнальный каскад, что приводит к выходу на поверхность МСК множества α1A адренорецепторов, что является признаком перехода МСК в инициированное состояние [9,10]. Происходит повышение чувствительности клеток к норадреналину, но ответ МСК на повторную добавку гормона формируется уже через α1A адренорецепторы и их кальций-зависимый сигнальный каскад, что приводит к усилению кальциевого ответа (рис. 1). Это явление мы назвали гетерологической сенситизацией (ГС), поскольку стимуляция одних рецепторов делает МСК более восприимчивыми к действию гормона за счёт сенситизации других рецепторов. ГС была показана при добавлении норадреналина после преинкубации с норадреналином или серотонином [8,11]. ГС характерна не для всех пациентов, у части исследуемых этого явления не наблюдалось. Такие отличия проявляются и при различных патологиях, в частности, как ранее было показано в нашей лаборатории, ГС приводит к развитию артериальной гипертензии при ожирении [11].

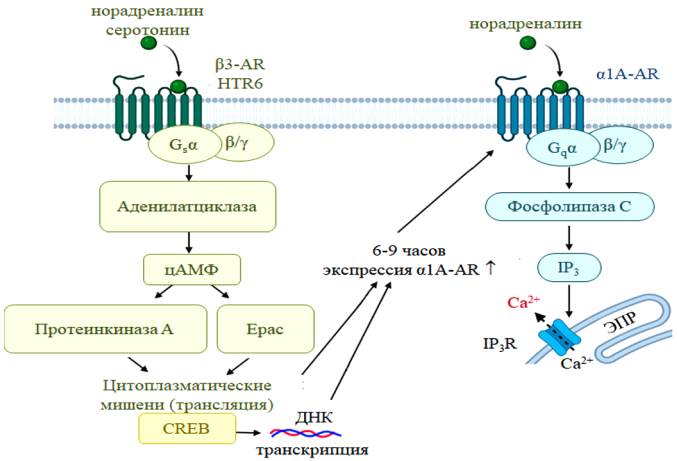


Рис. 1. Сигнальный каскад реакций, описывающий явление гетерологической сенситизации МСК, запускаемой действием на МСК сначала цАМФ-мобилизующего, а затем кальций-мобилизующего гормонов.

Методы. Опыты проводились на МСК из подкожной и висцеральной жировой ткани, выделенных из одних и тех же доноров. МСК обрабатывались сначала цАМФ-мобилизующими гормонами, а затем регистрировалась чувствительность клеток к различными кальций-мобилизующим гормонам. Интенсивность кальциевого ответа оценивалась с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Fluo8. Затем изучалось воздействие комбинаций гормонов, усиливающих кальциевый ответ МСК по сравнению с одиночным добавлением гормона, на дифференцировку МСК в адипоциты. Субтипы адипоцитов определялись методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии ключевых маркеров адипогенной дифференцировки адипонектина, лептина, PPARγ, UCP1.

Результаты. Мы показали, что различные комбинации цАМФ- и кальций-мобилизующих гормонов влияют на выбор пути дифференцировки МСК. В качестве цАМФ-мобилизующих гормонов в данной работе мы использовали норадреналин (1 мкМ), серотонин (10 мкМ), глутамат (10 мкМ), аденозин (10 мкМ), гистамин (10 мкМ), дофамин (50 мкМ) и паратиреоидный гормон (ПТГ, 10 нМ). При проведении пилотных экспериментов глутамат, аденозин, гистамин и дофамин не показали пермиссивного эффекта на МСК, поэтому далее в работе мы использовали только норадреналин, серотонин и ПТГ. Ранее в нашей лаборатории была подробно описана только классическая ГС для норадреналина после преинкубации с норадреналином [8,11], поэтому в своих опытах мы также разделяли пациентов на тех, у кого была классическая ГС и на тех, у кого она отсутствовала. Мы показали, что в МСК, выделенных из подкожной жировой ткани пациентов без классической ГС также не изменяется кальциевый ответ на такие кальций-мобилизующие гормоны, как дофамин (50 мкМ) [12], аденозин (10 мкМ) [13], серотонин (10 мкМ) [14], γ-аминомасляная кислота (ГАМК, 20 мкМ) [12], гистамин (10 мкМ) [15], глутамат (10 мкМ) [16], ПТГ (10 нМ), ангиотензин II (10 нМ) [17]. У пациентов с классической ГС мы наблюдали повышение чувствительности клеток к ангиотензину II через 6 часов после преинкубации с норадреналином для МСК подкожного жира. При этом МСК висцерального жира этих же доноров не показывали изменения чувствительности клеток ни к норадреналину, ни к ангиотензину II после преинкубации с норадреналином. Однако, данные клетки повышали свою чувствительность к аденозину после преинкубации с ПТГ. Также мы наблюдали тенденцию к изменению гормональной чувствительности для следующих комбинаций гормонов (табл. 1). МСК из висцеральной жировой ткани продемонстрировали отличную от МСК подкожной жировой ткани чувствительность к гормонам, что может свидетельствовать о существовании различных способов регуляции дифференцировки МСК в этих жировых депо.

Мы проверили, каким образом воздействие обнаруженными нами комбинациями гормонов на МСК перед индукцией их дифференцировки в адипоциты может влиять на выбор направления дифференцировки. Для этого за 7 часов до индукции дифференцировки мы преинкубировали клетки с первым гормоном пары, а через 6 часов производили инкубацию со вторым гормоном. После этого клетки отмывали от гормонов и направляли в адипогенную дифференцировку при помощи стандартного коктейля адипогенных факторов – инсулина (1.72 мкМ), дексаметазона (1 мкМ) и изобутилметилксантина (IBMX, 0.5 мМ).

Табл. 1. Комбинации гормонов, показавшие тенденцию к ГС для МСК подкожной и висцеральной жировой ткани.

МСК подкожной жировой ткани		МСК висцеральной жировой ткани	
цАМФ-мобилизующие гормоны (преинкубация)	кальций-мобилизующие гормоны (добавление)	цАМФ-мобилизующие гормоны (преинкубация)	кальций-мобилизующие гормоны (добавление)
норадреналин	аденозин	норадреналин	глутамат
ПТГ	гистамин	ПТГ	глутамат
ПТГ	ангиотензин II	серотонин	гистамин
серотонин	гистамин	серотонин	ПТГ
серотонин	ПТГ		

Под воздействием различных комбинаций цАМФ- и кальций-мобилизующих гормонов МСК дифференцировались в следующие субпопуляции адипоцитов:

– Адипоциты с множеством жировых капель с низким уровнем лептина и адипонектина. Предположительно такие адипоциты были гипертрофированы.

– Адипоциты с высоким уровнем лептина и низким уровнем адипонектина. Такое соотношение адипокинов является маркером окислительного стресса, провоспалительного фенотипа и инсулиновой резистентности и может соответствовать гипертрофии жировой ткани, то есть увеличению объёма имеющихся адипоцитов, которое наблюдается при «нездоровом ожирении».

– Адипоциты с высоким уровнем адипонектина и низким уровнем лептина. Такие адипоциты могут наблюдаться при гиперплазии жировой ткани, то есть увеличении количества адипоцитов при росте жировой ткани, причём адипоциты остаются метаболически здоровыми.

– Бежевые адипоциты с повышенным уровнем UCP1. Появление таких адипоцитов означает побурение жировой ткани и её способность к термогенезу [18].

Заключение. Комбинации цАМФ- и кальций-мобилизующих

гормонов, вызывающие явление гетерологической сенситизации, влияют на выбор пути дифференцировки МСК, причём влияние одних и тех же комбинаций гормонов на МСК подкожной и висцеральной жировых тканей различается.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-75-30007 (https://rscf.ru/project/19-75-30007/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoang D.M. et al. Stem cell-based therapy for human diseases // Sig Transduct Target Ther. 2022. Vol. 7, № 1. P. 272.
2. Maximow A.A. The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals.
3. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // Exp Hematol. 1976. Vol. 4, № 5. P. 267–274.
4. Mushahary D. et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells // Cytometry A. 2018. Vol. 93, № 1. P. 19–31.
5. Ong W.K., Chakraborty S., Sugii S. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine // Biomolecules. 2021. Vol. 11, № 7. P. 918.
6. Vishvanath L., Gupta R.K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity // Journal of Clinical Investigation. 2019. Vol. 129, № 10. P. 4022–4031.
7. Chen Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? // Cell Death Differ. 2016. Vol. 23, № 7. P. 1128–1139.
8. Chechekhin V. et al. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. 2023. Vol. 12, № 4. P. 585.
9. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // Sci Data. 2018. Vol. 5, № 1. P. 180196.
10. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. Activation of β-adrenergic receptors is required for elevated α1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells // Sci Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 32835.
11. Chechekhin V.I. et al. Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2024. Vol. 1871, № 2. P. 119651.
12. Marcoli M. et al. In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells // Pharmacological Research. 2008. Vol. 57, № 5. P. 374–382.
13. Gharibi B. et al. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes // Journal of Bone and Mineral Research. 2011. Vol. 26, № 9. P. 2112–2124.
14. Oh C.-M. et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues // Nat Commun. 2015. Vol. 6, № 1. P. 6794.

15. Nemeth K. et al. Characterization and Function of Histamine Receptors in Human Bone Marrow Stromal Cells // Stem Cells. 2012. Vol. 30, № 2. P. 222–231.
16. Kotova P.D. et al. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2014. Vol. 1843, № 9. P. 1899–1908.
17. Sysoeva V.Y. et al. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem Cell Research. 2017. Vol. 25. P. 115–122.
18. Frühbeck G. et al. Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome // Sci Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 6619.

ЧТО ПРОИСХОДИТ В МЕМБРАНЕ И ЛЮМЕНЕ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА С УЧАСТИЕМ КАЛЬЦИЯ И МИТОХОНДРИЙ?

Сурин А.М.

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Селективное ингибирование Ca^{2+} насосов эндоплазматического ретикулума (Ca^{2+}-АТФазы) с помощью тапсигаргина показало, что Ca^{2+} непрерывно вытекает из эндоплазматического ретикулума (ЭР) [1]. Последующие измерения концентрации Ca^{2+} в ЭР ($[Ca^{2+}]_{er}$) с помощью флуоресцентных белковых Ca^{2+}-сенсоров, имеющих адресную ЭР-локализацию, подтвердило падение $[Ca^{2+}]_{er}$ при аппликации тапсигаргина [2]. Возник вопрос о природе перманентной утечки Ca^{2+} из люмена ЭР. Почему клетки не ликвидируют этот «дефект» мембраны ЭР, а, напротив, неустанно тратят АТФ для непрерывной работы Ca^{2+}-АТФазы ради восстанавления градиента концентрации Ca^{2+} между люменом ЭР и цитозолем? Хорошо известные инозитолтрифосфатные и рианодиновые рецепторов открывают Ca^{2+} каналы только в ответ на воздействие соответствующих лигандов и не вовлечены в перманентную утечку Ca^{2+} из люмена ЭР в цитозоль. По крайней мере, в ипостаси зрелых трансмембранных лиганд-активируемых рецепторов в мембранах ЭР.

Все белки, которые предназначены для секреции во внеклеточную среду, а также все трансмембранные белки, включая лиганд- и потенциал-управляемые рецепторы, ионные каналы, насосы и обменники, транспортеры метаболитов должны по мере синтеза на рибосомах пройти сквозь мембрану ЭР в его люмен. Для большинства из перечисленных трансмембранных белков протаскивание полипептидной цепи в направлении люмена ЭР и обратно в цитозоль должны совершиться нескольку раз. Например, полипептидные цепи метаботропных рецепторов, сопряженных с G-белками, должна пронизать мембрану ЭР 7 раз. Учитывая то, что полипептидная цепь состоит из 20 аминокислотных остатков, различающихся боковыми группами, то вызывает удивление каким образом удается протянуть такой неоднородный полимер сквозь мембрану ЭР, не нарушив его ионной проводимости?

Было установлено, что доставка растущей на рибосоме полипептидной цепи в люмен ЭР осуществляется сложными белковыми комплексами по обе стороны мембраны шероховатого ретикулума. Особая роль принадлежит белкам-транслоконам семейства Sec61,

пронизывающим мембрану ЭР и служащим проводящим путем растущей полипептидной цепи. Процесс протягивания полипептидной цепи сопровождается встречным потоком Ca^{2+} из ЭР в цитозоль через транспортирующую часть транслокона. Именно этим феноменом обусловлено около 60% всей Ca^{2+} утечки [3], впервые выявленной при действии тапсигаргина [1]. Нарушения функционирования Sec61 влекут к различным видов рака, к нейродегенерации, а также отмечены при инфекционных заболеваниях [3]. Блокирование синтеза белка и соответственно его транспорта через транслокон предотвращает утечку Ca^{2+} из люмена ЭР. И наоборот, предотвращение перемещения Ca^{2+}вследствие опустошения люмена и понижения трансмембранного градиента концентрации Ca^{2+}, например, при ингибировании Ca^{2+}-АТФазы тапсигаргином, блокирует синтез белка [4] и транспорт белков сквозь ядерные поры [5]. Важную роль в упомянутых процессах принадлежит митохондриям, которые, взаимодействуя своими внешними мембранами с мембранами ЭР (структуры, названные MAMs), регулируют $[Ca^{2+}]_{er}$ [6,7]. Не исключено, что MAMs (или подобные им комплексы между этими органеллами) обеспечивают доставку АТФ в люмен ЭР для обеспечения созревания белков с участием шаперонов, а также для перемещения внутри мембран ЭР полипептидных цепей тех белков, которые функционируют как трансмембранные [8]. Регулирование этих процессов рассматривают как важное направление фундаментальных и прикладных исследований [9,10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Thastrup O. Role of Ca2+-ATPases in regulation of cellular Ca2+ signalling, as studied with the selective microsomal Ca2+-ATPase inhibitor, thapsigargin. Agents and Actions, 1990;29(1/2):8-15.
2. Arnaudeau S, Kelley W.L., Walsh J.V. Jr, Demaurex N. Mitochondria Recycle Ca2+ to the Endoplasmic Reticulum and Prevent the Depletion of Neighboring Endoplasmic Reticulum Regions. J Biol Chem. 2001;276(31):29430-29439.
3. Cavalié A. and Zimmermann R. Editorial: The evolving picture of Ca2+ leak from endoplasmic reticulum in health and diseases Front. Physiol. 2023;14:1182455.
4. Paschen W., Doutheil J., Gissel C., Treiman M. Depletion of Neuronal Endoplasmic Reticulum Calcium Stores by Thapsigargin: Effect on Protein Synthesis. J Neurochem.. 1996;67(4):1735-1743.
5. Greber U.F., Gerace L. Depletion of Calcium from the Lumen of Endoplasmic Reticulum Reversibly Inhibits Passive Diffusion and Signal-mediated Transport into the Nucleus. J Cell Biol. 1995;128(1,2):5-14

6. Kushnireva L., Korkotian E. Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Interaction in Central Neurons. InterOpen. 2022; http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105738
7. Kuijpers M., Nguyen P.T., Haucke V. The Endoplasmic Reticulum and Its Contacts: Emerging Roles in Axon Development, Neurotransmission, and Degeneration. Neuroscientist 2024, Vol. 30(5):545–559
8. Depaoli M.R., Hay J.C., Graier W.F., Malli R. The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum. Biol. Rev. 2019;94:610–628.
9. Jaskulska, A.; Janecka, A.E.; Gach-Janczak,K. Thapsigargin - From Traditional Medicine to Anticancer. Drug. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(4).
10. Sorout N., Helms V. Toward Understanding the Mechanism of Client-Selective Small Molecule Inhibitors of the Sec61 Translocon. J Molecular Recognition, 2025; 38:e3108:1-18.

УЧАСТИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ В ПТГ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК

Усачёв В.А., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Воронцова М.В.

МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Паратиреоидный гормон (ПТГ) является ключевым регулятором обновления и поддержания костной ткани. Однако, его практическое использование как стимулятора остеогенеза затруднено тем, что он может вызывать непредсказуемые побочные эффекты, такие как повышенная резорбция кости или кальцификаты мягких тканей. В связи с чем, выяснение возможных внутриклеточных механизмов действия ПТГ может помочь в разработке новых лекарственных препаратов или подходов, направленно влияющих на остеогенную дифференцировку и унифицирующих ответ клеток на ПТГ.

Основным рецептором паратиреоидного гормона на мезенхимных стволовых клетках (МСК) является рецептор паратиреоидного гормона 1 типа. Его особенность – способность связываться с двумя различными G-белками: Gs и Gq. Эти G-белки активируют два фермента – аденилатциклазу и фосфолипазу С соответственно. Целью нашей работы было определение вклада этих сигнальных путей в реализацию эффекта паратиреоидного гормона.

Материалы и методы. Для изучения активации аденилатциклазной и фосфолипазной систем в МСК под действием ПТГ был оценен кальциевый ответ одиночных клеток. Внутриклеточные ответы Ca^{2+} измеряли в отдельных клетках с использованием флуоресцентного кальциевого красителя Fluo-8 и инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2. Для анализа характера ответов на кальций мы записывали базовый уровень в течение 15 минут, затем добавляли 10 нМ ПТГ, не останавливая запись, и продолжали снимать в течение часа с интервалом 30 секунд. Видео анализировали с использованием программного обеспечения NIS-Elements и ImageJ. Изменения внутриклеточного Ca^{2+} по сравнению с уровнем покоя оценивали по относительным изменениям интенсивности флуоресценции Fluo-8 ($\Delta F/F0$), зарегистрированной в отдельной клетке. Процент ответивших клеток измеряли как отношение количества ответивших клеток к числу всех проанализированных клеток в полях зрения.

Влияние паратиреоидного гормона на дифференцировку изучалось добавлением в дифференцированные среды 10 нМ ПТГ. Дифференцировка МСК осуществлялась в среде DMEM low glucose с добавлением 10% FBS. Для индукции остеогенной дифференцировки в

среду дополнительно вносились CaCl2 (100 мг/л), дексаметазон (0,1 мкМ), аскорбиновая кислота (0,2 мМ), пируват натрия (0,11 мг/мл), глицерол-2-фосфат (10 мМ) и L-глутамином (2 мМ). Адипогенез стимулировался добавлением в среду инсулина (10 мкг/мл), IBMX (0.5 мМ) и дексаметазона (1 мкМ).

Результаты и обсуждения. Ранее нами был обнаружен механизм регуляции остеогенной дифференцировки МСК в зависимости от паттернов мобилизации внутриклеточного кальция в ответ на гормональный стимул. Паратиреоидный гормон способен вызывать в МСК три типа кальциевых ответов: одиночное транзиторное повышение внутриклеточного Ca^{2+}, кальциевые осцилляции; плавное повышение внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 1). Соотношение трех ответов определяло влияние ПТГ на остеогенную дифференцировку МСК [1].

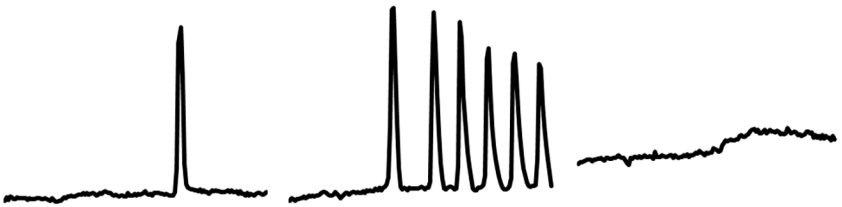


Рис. 1. Три типа ПТГ-зависимых кальциевых ответов МСК.

Применение ингибиторного анализа позволило установить, что характер кальциевых ответов на паратиреоидный гормон определяется активацией аденилатциклазного или фосфолипазного сигнального пути в МСК. Ингибирование аденилатциклаз (SQ22536) приводило к увеличению одиночными транзиторных ответов и осцилляций. Обработка МСК ингибитором фосфолиназы С (U73122) приводила к увеличению числа клеток, отвечающих плавным приростом. Однако ингибирование никогда не приводило к полному исчезновению какого-либо типа ответа, позволяя предположить, более сложную природу кальциевых ответов.

Вклад аденилатциклазной и фосфолипазной систем был также изучен на модели остеогенной дифференцировки МСК. Ингибирование аденилатциклаз приводило к антиостеогенному, а фосфолипаз С – проостеогенному действию паратиреоидного гормона. Таким образом, нами было установлено, что активация аденилатциклазного сигнального пути, сопровождаемая плавным повышением внутриклеточного кальция опосредует проостеогенное действие паратиреоидного гормона.

Применение неселективного ингибитора фосфолипазы С для унифицирования ответа МСК на ПТГ на практике невозможно в виду его сильного токсического действия. Поэтому было решено установить вклад

отдельных изоформ аденилатциклаз в реализацию проостеогенного эффекта паратиреоидного гормона.

Для подбора мишеней кандидатов мы изучили экспрессию мембранных изоформ аденилатциклаз, которые изменяются в процессе остеогенной дифференцировки. Были обнаружены две изоформы, экспрессия которых возрастала в процессе остеогенной дифференцировки МСК: аденилатциклазы 1 и 7. Данные изоформы были выбраны для оценки их вклада в ПТГ-сигнализацию. Для этого при помощи системы CRISPR/Cas9 D10A в МСК был осуществлен нокаут аденилатциклаз 1 и 7. На двух полученных нокаутных клеточных линиях было изучено действие паратиреоидного гормона.

На клетки дикого типа паратиреоидный гормон оказывает выраженное проостеогенное и антиадипогенное действие. Это согласуется с антагонистичностью остеогенной и адипогенной дифференцировок, при котором сигнальные пути, активирующие остеогенез, ингибируют адипогенез и наоборот [2].

Ответ нокаутных линий МСК отличался от клеток дикого типа. Помимо частичного нарушения дифференцировки, произошло «разделение» влияния ПТГ на дифференцировку. Нокаут аденилатциклазы 1 нарушил проостегенное действие ПТГ, сохранив антиадипогенный эффект. МСК, нокаутные по аденилатциклазе 7, наоборот, потеряли чувствительность к анитиадипогенному эффекту ПТГ, предположительно, сохранив эффект на остеогенную дифференцировку.

Для более детального изучения наблюдаемых явлений, мы решили оценить кальциевый ответ клеток с нокаутом аденилатциклаз 1 и 7 на паратиреоидный гормон. Клетки дикого типа демонстрировали все три ранее описанных типа кальциевых ответов, которые менялись под воздействием ингибиторов (рис. 2).

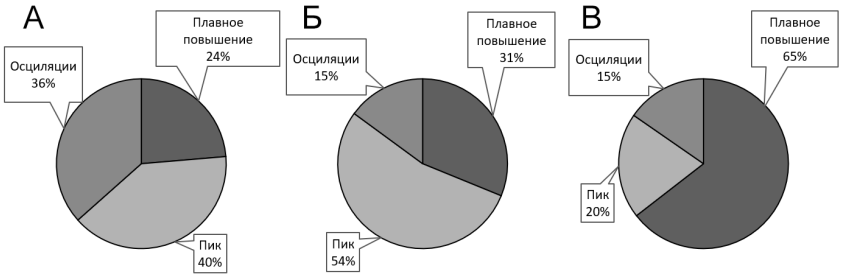


Рис. 2. Соотношение трех типов ПТГ-зависимых кальциевых ответов в МСК дикого типа: А – без предобработки ингибиторами, Б – с добавлением ингибитора аденилатциклазы, В – с добавлением ингибитора фосфолипазы С.

Нокаут аденилатциклазы 1 привел к тому, что МСК стали отвечать на паратиреоидный гормон аналогично клеткам дикого типа, обработанных ингибитором аденилатциклазы (рис. 3). Также мы также детектировали снижение количества осциллирующих клеток. Это позволяет предположить, что часть ранее наблюдаемых нами осцилляций имеет цАМФ-зависимую природу.

Рис. 3. Соотношение трех типов ПТГ-зависимых кальциевых ответов в МСК с нокаутом аденилатциклазы 1: А – без предобработки ингибиторами, Б – с добавлением ингибитора аденилатциклазы, В – с добавлением ингибитора фосфолипазы С.

Клетки с нокаутом аденилатциклазы 7 проявляют паттерн кальциевого ответа схожий с клетками дикого типа. Но у них наблюдается снижение в 2-3 количества одиночных транзиторных ответов (рис. 4).

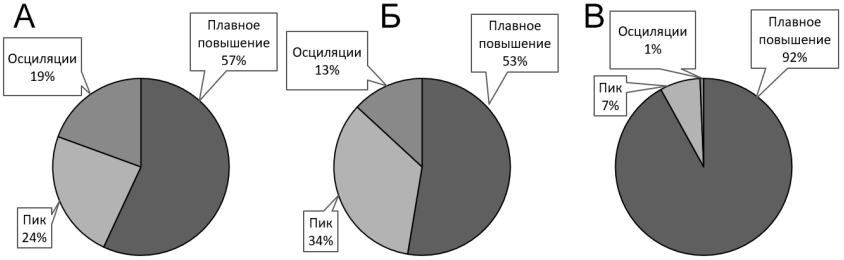


Рис. 4. Соотношение трех типов ПТГ-зависимых кальциевых ответов в МСК с нокаутом аденилатциклазы 7: А – без предобработки ингибиторами, Б – с добавлением ингибитора аденилатциклазы, В – с добавлением ингибитора фосфолипазы С.

Примечательно, что ингибирование фосфолипазы во трех клеточных линиях вызывало плавное повышение уровня внутриклеточного кальция. Это позволяет предположить, что с рецептор паратиреоидного гормона активирует и другие изоформы аденилатциклаз.

Выводы. Таким образом, наши данные позволяют предположить, что проостеогенное и антиадипогенное действие паратиреодного гормона представляют собой разные ветви ПТГ-зависимой регуляции дифференцировки МСК. В этом ключе, особый интерес, как потенциальная мишень для поиска новых индукторов остеогенеза, представляет аденилатциклаза 1. Однако, взаимосвязь между типами кальциевого ответа, аденилатциклазами и фосфолипазами может быть гораздо сложнее, чем кажется на первый взгляд.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-75-30007, https://rscf.ru/project/19-75-30007/ (биохимия и подходы в области молекулярной биологии) и гранта программы Научно-образовательных школ МГУ имени М.В. Ломоносова, проект № 23-SCH04-11 (клеточные модели).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kulebyakin K. et al. Dynamic balance between pth1r-dependent signal cascades determines its pro-or anti-osteogenic effects on MSC //Cells. – 2022. – V. 11. – №. 21. – P. 3519.
2. Chen Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? //Cell Death & Differentiation. – 2016. – V. 23. – №. 7. – P. 1128-1139.

Сигнализация в мышечных клетках

ЭКСПРЕССИЯ КЛЮЧЕВЫХ Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗ В ПОСТУРАЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Белова С.П., Тыганов С.А., Зарипова К.А., Шенкман Б.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Введение. Функциональная разгрузка скелетных мышц приводит к усилению протеасомной деградации, и ключевую роль в этом процессе выполняют Е3-лигазы атрогин-1/MAFbx и MuRF-1, экспрессия которых увеличивается уже в 1 сутки функциональной разгрузки у грызунов [1]. В регуляцию экспрессии MAFbx и MuRF-1 вовлечены транскрипционные факторы FOXO3, миогенин, транкрипционный коактиватор PGC1a, рецепторы IL6 и миостатин [2-4]. Shenhav Cohen и соавторы показали, что при катаболических состояниях распад белков тонких филаментов и z-диска опосредуется Е3-убиквитинлигазой Trim32 [5].

Несмотря на тот факт, что *m.soleus* является основной познотонической мышцей, данные по экспрессии мРНК MuRF-1 и MAFbx в *m.soleus* человека после относительно кратковременной антиортостатической гипокинезии в литературе отсутствуют, а данные на *m.vastus lateralis* противоречивы. Целью данной работы было исследование экспрессии Е3-убиквитинлигаз MuRF-1, MAFbx, Trim32 и особенностей их регуляции в постуральной *m.soleus* и локомоторной *m.vastus lateralis* при 21-суточной антиортостатической гипокинезии.

Эксперимент с антиортостатической гипокинезией (АНОГ) был проведен на базе ГНЦ РФ ИМБП РАН. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25-35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона –6°. Игольчатая биопсия проводилась по методу Бергстрема до гипокинезии и на 21 сутки гипокинезии.

Результаты. После 21-суточной АНОГ экспрессия MuRF1 была увеличена только в *m.soleus* на 30,6%, а экспрессия MAFbx была увеличена в обеих мышцах – на 46,3 % в *m.VL* и на 66,0% в *m.soleus*. Экспрессия Trim32 увеличивалась после АНОГ и в *m.soleus* на 41,4% и в *m.vastus lateralis* на 31,6%.

После АНОГ в *m.soleus* наблюдалось снижение на 59% уровня фосфорилирования транскрипционного фактора FoxO3 и увеличение его экспрессии на 40 %, в то время как в *m.VL* значимых изменений не наблюдалось. Экспрессия миогенина была увеличена после АНОГ в обеих мышцах – в *m.VL* на 40,0 % и в *m.soleus* на 46,4 %. Экспрессия транскрипционного коактиватора PGC1a снижалась в обеих мышцах –

20,6% в *m.VL* и на 38,8% в *m.soleus*. Экспрессия рецепторов IL-6 увеличивается в *m.VL* на 38% и в *m.soleus* на 72%. Экспрессия миостатина возрастала на 49,2% в *m.VL* и 157,8% в *m.soleus.*

Выводы. 21-суточноя антиортостатическая гипокинезия приводит к активации Е3-убиквитинлигаз MAFbx и Trim32 как в постуральной так и локомоторной мышце и сопровождается увеличением экспрессии миогенина, рецепторов IL-6, миостатина и снижением экспрессии PGC1a. Экспрессия MuRF1 и транскрипционного фактора FOXO3 наблюдается только в постуральной *m.soleus.*

Работа поддержана грантом РНФ № 22-75-00065.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zaripova K. A., Kalashnikova E. P., Belova S. P., Kostrominova T. Y., Shenkman B. S., Nemirovskaya T. L.* Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading // Int J Mol Sci. 2021. V.22.
2. *Cannavino J., Brocca L., Sandri M., Bottinelli R., Pellegrino M. A.* PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice // J Physiol. 2014. V.592. P.4575-4589.
3. *McFarlane C., Plummer E., Thomas M., Hennebry A., Ashby M., Ling N., Smith H., Sharma M., Kambadur R.* Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism // J Cell Physiol. 2006. V.209. P.501-514.
4. *Yakabe M., Ogawa S., Ota H., Iijima K., Eto M., Ouchi Y., Akishita M.* Inhibition of interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy // PLoS One. 2018. V.13. P.e0191318.
5. *Cohen S., Zhai B., Gygi S. P., Goldberg A. L.* Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy // J Cell Biol. 2012. V.198. P.575-589.

ПРИ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ИСЧЕЗАЕТ ВКЛАД $К_{АТР}$-КАНАЛОВ В NO-ОПОСРЕДОВАННОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ, ЧТО МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНО С НАРУШЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ИХ СУБЪЕДИНИЦ

Давыдова М.П., Марков М.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Опосредованное NO расслабление осуществляется не только путем активации растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) с последующей активацией зависимой от цГМФ протеинкиназы, но и за счет прямого действия оксида азота на ионные каналы цитоплазматической мембраны [5,7]. Относительный вклад этих путей может изменяться [4]. Ранее нами было показано, что внутрилегочные артерии малого диаметра интактных крыс при использовании низких концентраций донора NO расслабляются в основном за счет активации $К_{АТР}$-каналов, а при увеличении концентрации донора оксида азота возрастает роль зависимых от рГЦ механизмов вазодилатации [3]. При легочной гипертензии (ЛГ), независимо от патогенеза, страдает эндотелий-зависимое расслабление легочных артерий. Результаты многочисленных исследований указывают на наличие изменений как на уровне эндотелия, так и на уровне гладких мышц. В том числе многими авторами было продемонстрировано снижение продукции NO и уменьшение активности рГЦ. Однако в этих исследованиях не обращали внимание на соотношение вкладов зависимых и независимых от рГЦ путей реализации NO-опосредованного расслабления.

Целью данной работы было оценить относительный вклад рГЦ-зависимого пути и $К_{АТР}$-каналов как эффекторного звена рГЦ-независимого пути в вызванное NO расслабление легочных артерий при моделировании на крысах ЛГ.

Материалы и методы. Исследование было проведено на самцах белых беспородных крыс. Для получения ЛГ у крыс использовали ранее разработанный метод - одностороннее необратимое прекращение кровотока по общей сонной артерии. В возрасте 6-7 недель крыс наркотизировали гексобарбиталом (150 мг/кг, внутрибрюшинно), выделяли левую общую сонную артерию, перевязывали ее и пересекали. Как показали контрольные опыты с необратимой односторонней ишемией каротидного тельца и односторонним удалением каротидного тельца, в данной модели ЛГ ведущим фактором изменений структуры легочных артерий является именно ишемия каротидного тельца [1].

Через месяц после операции крыс повторно наркотизировали, вскрывали грудную клетку и извлекали левое легкое. Эксперименты на изолированных сосудах были выполнены по ранее описанной методике [4]. Дилататорные реакции ответвления внутрилегочной артерии второго порядка были исследованы в режиме постоянного потока (2 мл/мин). Внешний проток термостатируемой камеры (38 °C) был равен 4 мл/мин. Для перфузии использовали раствор Кребса-Хенсляйта. Тестирование дилататорных реакций проводили на фоне тонического сокращения в ответ на перфузию серотонином в концентрации 5×10^{-6} М. В качестве донора NO для NO-зависимой вазодилатации был использован нитропруссид натрия (SNP) в диапазоне концентраций от 10^{-11} до 10^{-7} М. Для подавления NO-зависимого расслабления использовали ингибитор рГЦ ODQ (10^{-6} М) и блокатор K_{ATP}-каналов глибенкламид (5×10^{-6} М). Перфузия блокатором калиевых каналов или ингибитором рГЦ начиналась после достижения плато тонического сокращения в ответ на серотонин, затем на фоне перечисленных агентов подавались растворы SNP в порядке возрастания концентрации. Также оценивали дилатацию в ответ на перфузию ингибитором фосфодиэстеразы V-го типа Zaprinast, который использовали в диапазоне концентраций от 1 до 30 мкМ.

Кроме физиологических экспериментов, была проведена оценка экспрессии субъединиц K_{ATP}-каналов в образцах внутрилегочных артерий второго порядка. Крыс наркотизировали гексобарбиталом (150 мг/кг, внутрибрюшинно), вскрывали грудную клетку, извлекали легкие. Препаровку артерий легких проводили на холоду с использованием охлажденного раствора Кребса-Хенсляйта. Выделение мРНК осуществлялось непосредственно после взятия биоматериала, отдельно для каждого экспериментального животного, хлороформно-фенольным методом с использованием TRI REAGENT. Исследование экспрессии мРНК проводили для всех образцов одновременно. Выделенные образцы мРНК перед обратной транскрипцией разводили в 20 мкл обработанной DEPC воды с ингибитором РНКаз. Качество выделенной РНК определяли с помощью фореза в агарозном геле. От ДНК-азной обработки отказались вследствие малого количества мРНК в образцах. Успешность обратной транскрипции оценивали по результатам ПЦР на β-актин. Праймеры подбирали в программе DNASTAR так, чтобы они соответствовали разным экзонам и с учетом наличия альтернативного сплайсинга для гена SUR2. Использовали следующие пары праймеров: β-актин (U): 5'-tgacgttgacatccgtaaagacctc-3'; (L): 5'-gtaaaacgcagctcagtaacagtccg-3' (t° отжига 59 °C, 41 цикл) ; SUR2B (U): 5'-ggatcgcacggttgtaaccatagc-3'; (L): 5'-gacggtaggcatcgagacacaggt-3' (t° отжига 60.3 °C, 49 циклов); Kir6.1 (U): 5'-tatcatgtggtggctggtggc-3'; (L): 5'-agcgtctctgcccttctgtgg-3' (t° отжига 58.1 °C, 53

цикла). Результаты ПЦР анализировали электрофоретически, документировали и обсчитывали при помощи программы Gellmager. Наличие мРНК считали доказанным в тех образцах, в которых в результате электрофореза в 2%-ном агарозном геле наблюдалась полоса, соответствующая ДНК ожидаемой длины при отсутствии такой полосы в пробе без обратной транскрипции. Для подсчета относительного содержания ампликонов вычисляли разность яркости пробы, в которой прошла обратная транскрипция, и соответствующей пробы без обратной транскрипции. Результат ПЦР для Kir6.1 и SUR2B нормировали на полученные значения для β-актина.

Статистическую обработку проводили с помощью программы SPSS 15.0 for Windows. После оценки вероятности нормального распределения выборки с помощью критерия Колмогорова-Смирнова использовали непарный t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна-Уитни. На графиках, соответственно, показаны средние и стандартные отклонения или медианы и первый и третий квартили.

Результаты. Использованная модель характеризуется развитием в течение месяца умеренной ЛГ с гиперплазией гладких мышц легочных артерий малого диаметра и повышением систолического давления в легочном стволе в среднем до 38 мм рт. ст. Можно предположить, что в сосудах с малым числом слоев гладкомышечных волокон NO не нуждается в амплификации сигнала, опосредованной рГЦ и цГМФ-зависимой протеинкиназой, и в большей мере действует напрямую на калиевые каналы. На фоне гиперплазии медии роль рГЦ-зависимого механизма может возрасти. Действительно, в контрольной группе значимое подавление расслабления в ответ на донор NO ингибитором рГЦ было получено только для наиболее высоких из используемых концентраций SNP (рис. 1); с другой стороны, для легочных артерий крыс с ЛГ было выявлено увеличение влияния ингибитора рГЦ на вызванное оксидом азота расслабление (было получено подавление расслабления на фоне ODQ на 50-80% при перфузии всех используемых концентраций SNP, рис. 1).

При перфузии легочных артерий ингибитором фосфодиэстеразы V-го типа не было обнаружено значимых отличий между контрольной группой и группой с моделированной ЛГ. Zaprinast в наибольшей из использованных концентраций – 30 мкМ – вызывал снижение вызванного серотонином тонического сокращения в среднем на 72% в группе с ЛГ и 80% в контрольной группе. Вследствие этого представляется вероятным, что несмотря на увеличение значения рГЦ в NO-опосредованном расслаблении при моделировании ЛГ, внутриклеточные системы, опосредующие рГЦ-зависимый путь, находятся в одинаковом состоянии в гладкомышечных клетках легочных артерий исследуемых групп.

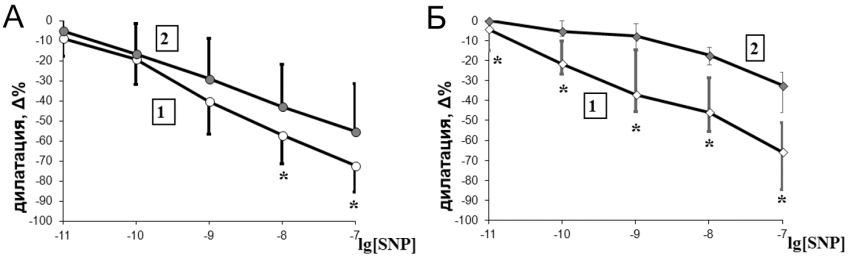


Рис. 1. Влияние ингибирования рГЦ на индуцированное NO расслабление легочных артерий у интактных крыс (А) и при моделировании ЛГ (Б).(2) – расслабление на фоне перфузии ингибитором рГЦ; (1) – без ингибитора. * $p<0.05$, t-test (А), U-test (Б).

Блокатор $К_{АТР}$-каналов в контрольных экспериментах приводил к уменьшению эффективности опосредованного NO расслабления только при перфузии низкими концентрациями SNP – 10^{-10} М и 10^{-9} М. Ингибирующий эффект глибенкламида на дилатацию, вызванную донором NO, может указывать на прямую активацию этих каналов оксидом азота, так как эффект наблюдали в другом диапазоне концентраций SNP, по сравнению с диапазоном, в котором обнаружили эффект за счет ингибирования рГЦ. У интактных крыс на фоне глибенкламида дилатация составляла до 40% от расслабления на предъявление таких же концентраций SNP в опытах без блокатора. В группе с моделированной ЛГ блокатор калиевых $К_{АТР}$-каналов не имел никакого эффекта (рис. 2).

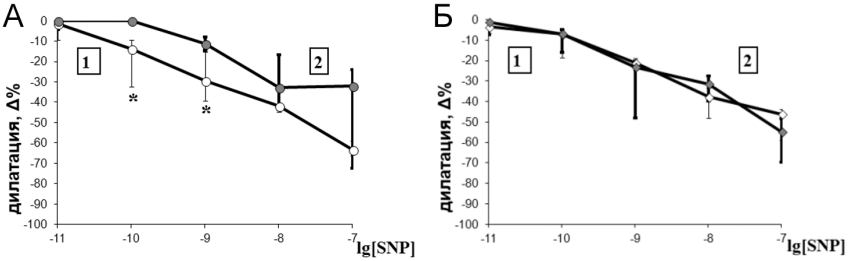


Рис. 2. Влияние ингибирования $К_{АТР}$-каналов на индуцированное NO расслабление легочных артерий у интактных крыс (А) и при моделировании ЛГ (Б).(2) – расслабление на фоне перфузии блокатором $К_{АТР}$-каналов; (1) – без блокатора. * $p<0.05$, U-test.

Прямая активация K_{ATP}-каналов оксидом азота наравне с процессами, опосредуемыми рГЦ, по-видимому, является основным механизмом реализации дилатации легочных артерий. Совместное применение ODQ и глибенкламида на изолированных легочных артериях интактных крыс приводит к практически полной отмене дилатации на SNP в диапазоне концентраций до 10^{-8} М, рис. 3. (данные не опубликованы).

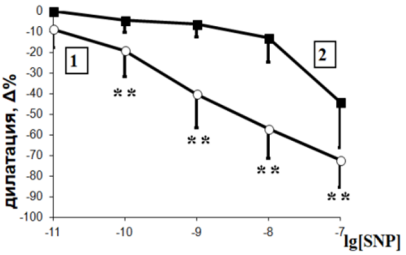


Рис. 3. Подавление NO-опосредованного расслабления при совместном действии ингибитора рГЦ и блокатора K_{ATP}-каналов.).(2) – расслабление на фоне перфузии ингибиторами рГЦ и K_{ATP}-каналов; (1) – без ингибирования. ** $p<0.01$, t-test

Таким образом, легочные артерии крыс с ЛГ потеряли один из важных путей NO-опосредованного расслабления. Известно, что активация протеинкиназы С способствует ингибированию K_{ATP}-каналов [6]. Развитие ЛГ связано с увеличением концентрации Ca^{2+} в гладкомышечных клетках легочных артерий, а, следовательно, можно ожидать ингибирования K_{ATP}-каналов [2] (в случае использованной модели триггером для увеличения Ca^{2+} в гладкомышечных клетках видимо, является активация симпатической нервной системы за счет гипоксии каротидного тельца). С другой стороны, уменьшение значения K_{ATP}-каналов для опосредуемого NO расслабления может быть следствием уменьшения экспрессии их субъединиц. Оценка уровня экспрессии порообразующей субъединицы Kir6.1 и регуляторной субъединицы SUR2B, характерных для гладких мышц кровеносных сосудов, показала лишь тенденцию к снижению их мРНК в группе с моделированной ЛГ. Кроме этого, в образцах крыс с ЛГ соотношение уровня экспрессии SUR2B и Kir6.1 было в основном или больше того, что получили в контрольной группе, или меньше (рис. 4). Эти относительные значения не отражают действительного соотношения мРНК Kir6.1 и SUR2B, но указывают на нарушение баланса их экспрессии при ЛГ.

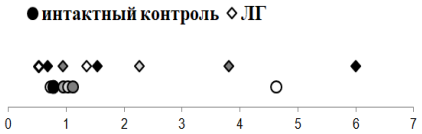


Рис. 4. Соотношение экспрессии SUR2B и Kir6.1 в контрольной группе (○) и при моделировании ЛГ (◆).

Заключение. В норме для легочных артерий роль зависимого от рГЦ пути NO-опосредованной дилатации не существенна, но в использованной модели ЛГ структура NO-опосредованного расслабления легочных артерий смещается в сторону рГЦ-зависимых механизмов, при том что внутриклеточные рГЦ-опосредованные пути вазодилатации в целом не изменяются. Наблюдаемый эффект можно отчасти расценивать как адаптацию в условиях гиперплазии медии, так как гладкие мышцы таким образом переходят на путь реализации вазодилатации, имеющий множительный эффект. K_{ATP}-каналы для NO-опосредованного расслабления перестают иметь значение, что может быть связано как с непосредственно регуляцией их активности за счет пути, который включает увеличение уровня кальция в клетках и активацию протеинкиназы С, так и с нарушением регуляции экспрессии генов порообразующей субъединицы и регуляторной субъединицы K_{ATP}-каналов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдова МП., Марков МА. Новая модель легочной гипертензии как следствие односторонней ишемии каротидных телец. *Технологии живых систем.* 2022;19(1):20-27.
2. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(27):11418-11423.
3. Davydova MP. The Structure of NO-Mediated Dilatation of Pulmonary Arteries Depends on NO Availability. *Bull Exp Biol Med*. 2019;167(2):247-249.
4. Davydova MP. Modeling of Hypervolemia in Pulmonary Circulation in Rats Changes the Structure of NO-Mediated Relaxation of Pulmonary Arteries. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(3):314-317.
5. Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+}-dependent K^+ channels (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1998;124(6):1131-1140.
6. YokoshikiH, SunagawaM, SekiT, SperelakisN. ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 1998;274 (Cell Physiol.43):25-37.
7. Yuan X-J, Tod ML., Rubin LJ, Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996;93(19):10489-10494.

ВЛИЯНИЕ 3-НЕДЕЛЬНОЙ ГИПОКИНЕЗИИ НА ПРОФИЛЬ мРНК И микроРНК В РАЗНЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ НОГ У ЧЕЛОВЕКА

Махновский П.А.[1], Панкратьева П.А.[1,2], Борзых А.А.[1]
Курочкина Н.С.[1], Попов Д.В.[1]

[1]ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
[2]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Гипокинезия (постельный режим или иммобилизация ноги) приводит к снижению массы скелетных мышц ног со скоростью 0.4-0.5% в сутки, максимальной силы и аэробной работоспособности [1-3]. Хронически пониженная двигательная активность может приводить к потере инсулиновой чувствительности скелетных мышц и организма, сахарному диабету 2 типа [4], сердечно-сосудистым заболеваниям [5]. Интересно, что гипокинезия оказывает более выраженное негативное влияние на постуральные мышцы, такие как «медленная» камбаловидная мышца (*m. soleus*), чем на другие мышцы ног [6]. Вызванные гипокинезией изменения транскриптома также более выражены в *m. soleus* [7], что предполагает существенные отличия в регуляции экспрессии генов в этой мышце. Механизмы, лежащие в основе такого специфического ответа, остаются неясными. МикроРНК являются одним из механизмов регуляции экспрессии генов. Роль этого механизма в регуляции изменений транскриптома в скелетных мышцах человека при гипокинезии до сих пор не изучена.

Цель исследования – изучить влияние 3-недельной гипокинезии на экспрессию генов (мРНК и микроРНК) в скелетных мышцах с различными функциональными возможностями (*m. vastus lateralis* и *m. soleus*).

Организация и методы исследования. В эксперименте участвовали двенадцать молодых мужчин, которые в течение 21 суток находились в условиях антиортостатической постельной гипокинезии (АНОГ) (возраст 28 лет [27-33]; и индекс массы тела 23,4 [22,3-26,9] кг/м^2). До и после АНОГ оценивали максимальную произвольную силу и аэробную работоспособность мышц-разгибателей колена и сгибателей голеностопа. За 14 суток до и через 20 суток после АНОГ с помощью игольчатой биопсии брали пробы ткани из четырехглавой мышцы бедра (*m. vastus lateralis*) и камбаловидной мышцы (*m. soleus*) для оценки изменений транскриптомного профиля мРНК и микроРНК.

Для всех 48 образцов были приготовлены цепь-специфичные библиотеки для мРНК и микроРНК. Библиотеки секвенировали на приборе NextSeq 550 (Illumina, США) в режиме одноконцевых прочтений (75 пар нуклеотидов) со средней глубиной 66 и 6.8 миллионов прочтений на образец для мРНК и микроРНК, соответственно.

Процессинг сырых данных включал тримминг адаптеров (Trimmomatic v 0.36), для мРНК – картирование на сборку генома GRCh38.p13 (hisat2 v.2.2.1), для микроРНК – картирование на первичные микроРНК (bowtie, база данных miRBase) и на геном GRCh38.p13 (hisat2 v.2.2.1 + bowtie). Анализ дифференциально экспрессируемых генов проводили с помощью пакета R DESeq2. Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) были определены как белок-кодирующие гены (либо микроРНК) с Padj <0.01 (с поправкой Бенджамини-Хохберга), изменением экспрессии >25%, TPM>1. Анализ обогащения функциональных категорий проводили с помощью инструмента DAVID (словари UNIPROT KW BP/CC, KEGG PATHWAY и GENE ONTOLOGY BP/CC DIRECT). Для предсказания мишеней микроРНК использовали базу данных DIANA-microT.

Результаты. АНОГ вызвала изменение функциональных возможностей мышц: снизила максимальную произвольную силу как в разгибателях колена, так и в сгибателях голеностопа, однако падение максимальной аэробной работоспособности наблюдалось только для мышц голени. Анализ изменения транскриптомного профиля в ответ на 3-недельную гипокинезию в мышцах *m. vastus lateralis* и *m. soleus* выявили сотни общих для обеих мышц дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), однако ответ *m. soleus* оказался намного более выражен (2018 *vs.* 589 ДЭГ, соответственно) и включал 1569 специфических генов. Общий для обеих мышц ответ (449 ДЭГ) выражался в снижении экспрессии генов митохондриальных белков, ферментов метаболизма жирных кислот, саркомерных белков. Специфическое влияние АНОГ на транскриптомный профиль *m. soleus* заключалось в снижении экспрессии большого количества генов, кодирующих митохондриальные белки (включая рибосомальные белки, ферменты всех дыхательных комплексов и цикла трикарбоновых кислот), белков липидного обмена, ферментов гликолиза и саркомерных белков. Специфическая для *m. soleus* активация экспрессии генов (557 ДЭГ) была ассоциирована с функциями воспаления/врожденного иммунитета. Эти гены были широко представлены генами цитокинов/хемокинов и их рецепторов, рецепторных тирозинкиназ и их лигандов, компонентов сигнальных путей JAK-STAT и NFKB.

Для поиска потенциального влияния микроРНК на изменение экспрессии генов в ответ на 3-недельную гипокинезию в мышцах был проанализирован транскриптом фракции малых РНК. В обеих мышцах детектировано 460 различных микроРНК, 17 из которых изменили экспрессию (13 увеличили) в *m. soleus*, тогда как для *m. vastus lateralis* изменений обнаружено не было. С помощью базы данных DIANA-MicroT были выявлены взаимодействия микроРНК-транскрипт и потенциальные мишени микроРНК, изменивших экспрессию. Среди генов, снизивших

экспрессию после 3-недельной гипокинезии было выявлено 509 мРНК, являющихся потенциальными мишенями микроРНК, увеличивших экспрессию. Корреляционный анализ выявил связи экспрессии некоторых пар микроРНК – мРНК, например, miR-378a-3p – CCDC141, miR-12136 – PIK3R1 и др.

Заключение. Таким образом, трехнедельная АНОГ вызвала масштабные изменения транскриптома. Ответ, общий для обеих мышц, был связан с подавлением нескольких генов, кодирующих митохондриальные белки, регуляторы углеводного и жирового обмена, а также с активацией нескольких генов, кодирующих цитокины и их рецепторы. В *m. soleus* эти изменения были значительно более выражены (по амплитуде и количеству генов) и связаны с активацией воспалительной сигнализации и снижением аэробной (выносливости) работоспособности мышц-сгибателей голеностопного сустава. Примечательно, что изменение уровня микроРНК было обнаружено только в *m. soleus* (13 генов увеличили, 4 – снизили экспрессию). Для микроРНК, изменивших содержание, были выявлены потенциальные гены-мишени (мРНК), некоторых из которых отрицательно коррелировали с изменением содержания мРНК.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ на основании соглашения № 25-75-20005.

ЛИТЕРАТУРА

1. Narici MV, de Boer MD. Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. *Eur J Appl Physiol*. 2011; 111:403-420
2. Marusic U, Narici M, Simunic B, Pisot R, Ritzmann R. Nonuniform loss of muscle strength and atrophy during bed rest: a systematic review. *J Appl Physiol 1985 2021;* (131):194-206
3. Hackney KJ, Ploutz-Snyder LL. Unilateral lower limb suspension: integrative physiological knowledge from the past 20 years (1991-2011). *Eur J Appl Physiol.* 2012; 112:9-22
4. Mikines KJ, Richter EA, Dela F, Galbo H (1991) Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body. *J Appl Physiol 1985*. 1991; (70):1245-1254
5. Dittmer DK, Teasell R. Complications of immobilization and bed rest. Part 1: Musculoskeletal and cardiovascular complications. *Can Fam Physician*. 1993; 39:1428-32, 1435-7.
6. Hardy EJ, Inns TB, Hatt J, Doleman B, Bass JJ, Atherton PJ, Lund JN, Phillips BE. The time course of disuse muscle atrophy of the lower limb in health and disease. J. Cachexia. Sarcopenia Muscle, 13 (2022), pp. 2616-2629
7. Borzykh AA, Zhedyaev RY, Ponomarev II, Vepkhvadze TF, Zgoda VG, Orlova MA, Vavilov NE, Shishkin NV, Lednev EM, Makhnovskii PA, et al.. Multidirectional effect of low-intensity neuromuscular electrical stimulation on gene expression and phenotype in thigh and calf muscles after one week of disuse. *Eur J Appl Physiol*. 2025 Apr 2.

ОЦЕНКА РОЛИ Na,K-АТФазы И DHPR ПРИ 3-ДНЕВНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ КРЫС НА СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ Ca^{2+} И СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *M. SOLEUS*

Немировская Т.Л., Шарло К.А., Тыганов С.А., Сидоренко Д.А., Боков Р.О., Зарипова К.А.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Введение. Мышечная атрофия и снижение силы проявляются очень быстро при бездействии или механической разгрузке, и наибольшая скорость снижения наблюдалась на ранних стадиях постельного режима [1]. При функциональной разгрузке происходит накопление макроэргических фосфатов и ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах [2,3], а также снижение мышечной силы и жесткости. Самым ранним эффектом разгрузки (первые 24 ч) на постуральную мышцу является деполяризация сарколеммы вследствие нарушения функции Na,K-АТФазы из-за инактивации ее α2-субъединицы [4-6]. Деполяризация предшествует явной атрофии скелетных мышц. Ранее показано, что активация паннексиновых каналов, пропускающих АТФ, происходит при деполяризации мембраны [7]. Мы предположили, что, 1) предотвратив деполяризацию мембраны введением оубаина, а также 2) ингибировав дигидропиридиновые рецепторы при разгрузке мышц нифедипином, мы сможем повлиять на содержание АТФ и Ca^{2+} в волокнах, а также на жесткость и сократительные свойства *m. soleus*.

Материалы и методы. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протоколы № 673 и 674 от 02 декабря 2024 г.). По 48 особей крыс самцов линии Wistar массой 180-200 г были взяты для обоих экспериментов, и каждая из групп (по 48 крыс) была равномерно разделена на 3 группы по 16 животных в каждой. Такой размер выборки связан с тем, что для определения Ca^{2+} в волокнах и механических свойств необходима целая мышца *ex temporo*, а для выделения белка *m. soleus* была заморожена в жидком азоте. Первая группа служила интактным контролем (группа C, n = 16) с в/брюшинным введением плацебо (физраствор), 2-ю группу подвергали вывешиванию в течение 3 сут с в/брюшинным введением плацебо (группа HS, n = 16), 3-й группе вывешенных в течение 3 сут крыс вводили в/брюшинно нифедипин (5 мг/кг/сут) (группа HSN, n = 16), а во втором случае – оубаин (1 мкг/кг/сут) (группа HSO, n = 16). Оубаин – это сердечный гликозид, который связывается с α-субъединицей Na,K-АТФазы. Ранее показано, что инъекции оубаина в низких дозах (1 мкг/кг/сут) предотвращали вызванную функциональной разгрузкой деполяризацию сарколеммы

m. soleus крыс (6). После завершения каждого эксперимента для определения Ca^{2+} препарированную *m. soleus* фиксировали в чашке Петри, промывали раствором Рингера-Кребса, затем окрашивали в течение 40 мин в темноте в растворе 5 мкМ Rhod-2AM и 5 мкМ Oregon green bapta AM 1 (Invitrogen, США) с добавлением 0,001 % Pluronic. Измерение силы изолированной *m. soleus* проводили *ex vivo*. Измеряли максимальную силу одиночных сокращений, максимальную силу тетанического сокращения и время полурасслабления, а также жесткость мышцы. Для нормализации показателей рассчитывали физиологическое поперечное сечение мышцы. Содержание белка определяли с помощью иммуноблоттинга. Соответствие данных нормальному распределению проверяли по критерию Шапиро – Уилка. Так как все полученные данные были распределены нормально, достоверность различий между группами определяли с использованием анализа ANOVA с поправкой на множественные сравнения Тьюки.

Результаты и обсуждение. При введении препаратов (нифедипин и оуабаин) при 3-суточном вывешивании наблюдали такую же атрофию *m. soleus* крыс, как в группах без введения препарата. Но введение как нифедипина, так и оуабаина предотвратило увеличение уровня Ca^{2+} в миоплазме мышечного волокна, что было характерно для чистого вывешивания (увеличение на 70% и 42% относительно интактного контроля, соответственно, $P<0.05$). Введение нифедипина при 3-суточной разгрузке предотвращает достоверное снижение максимальной силы одиночного и тетанического сокращения в отличие от группы чистого вывешивания (на 24% и 29% относительно интактного контроля, соответственно, $P<0.05$). При введении оуабаина наблюдалась уменьшение удельной максимальной силы одиночного и тетанического сокращения (на 22% и 18%, соответственно, $P<0.05$) у животных, подвергнутых вывешиванию (без препарата и с ним), относительно интактного контроля, но без значительной разницы между ними. Но препарат значимо повлиял на пассивные механические свойства *m. soleus*: максимальная пиковая сила и максимальная сила в конце теста на растяжение в мышцах с введением оуабаина не отличалась от группы интактного контроля, тогда как в группе с чистым вывешиванием она уменьшилась (на 33% и 34%, соответственно, $P<0.05$). Экспрессия мРНК кальпаина 1 в группе, вывешенной с оуабаином, не отличалась от группы интактного контроля (в группе чистого вывешивания она была выше на 40%, $P<0.05$). В свою очередь, 3-суточное ингибирование DHPR при функциональной разгрузке (введение нифедипина) предотвращает протеолиз джанктофиллина 1 в *m. soleus*, который наблюдался при чистом вывешивании (уменьшение на 50% относительно интактного контроля, $P<0.05$).

Вывод. Введение нифедипина и оубаина приводит к предотвращению повышения уровня Ca^{2+} в миоплазме и влияет на сократительные характеристики и пассивные механические свойства *m. soleus*. Эти изменения, вероятно, могут быть связаны с предотвращением распада цитоскелетных белков.

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 24-15-00088.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marusic U, Narici M, Simunic B, Pisot R, Ritzmann R. Nonuniform loss of muscle strength and atrophy during bed rest: A systematic review. J Appl Physiol 131: 194-206, 2021. doi: 10.1152/japplphysiol.00363.2020.
2. Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB. Intracellular Ca2+ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. J Appl Physiol 87: 386-390, 1999. doi: 10.1152/jappl.1999.87.1.386.
3. Zaripova KA, Kalashnikova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL. Role of pannexin 1 atp-permeable channels in the regulation of signaling pathways during skeletal muscle unloading. Int J Mol Sci 22: 1-14, 2021. doi: 10.3390/ijms221910444.
4. Kravtsova V V., Matchkov V V., Bouzinova E V., Vasiliev AN, Razgovorova IA, Heiny JA, Krivoi II. Isoform-specific Na, K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. Biomed Res Int 2015: 1-11, 2015. doi: 10.1155/2015/720172.
5. Kravtsova V V., Petrov AM, Matchkov V V., Bouzinova E V., Vasiliev AN, Benziane B, Zefirov AL, Chibalin A V., Heiny JA, Krivoi II. Distinct α2 Na,K-ATPase membrane pools are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse. J Gen Physiol 147: 175-188, 2016. doi: 10.1085/jgp.201511494.
6. Kravtsova V V., Bouzinova E V., Matchkov V V., Krivoi II. Skeletal muscle Na,K-ATPase as a target for circulating ouabain. Int J Mol Sci 21: 1-15, 2020. doi: 10.3390/ijms21082875.
7. Díaz-Vegas A, Eisner V, Jaimovich E. Skeletal muscle excitation-metabolism coupling. Arch Biochem Biophys 664: 89-94, 2019.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЫШЦ ГОЛЕНИ КРЫСЫ В МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЯ ДВИЖЕНИЯ

Сабирова Д.Э.[1,2], Шадрина А.А.[2], Еремеев А.А.[1], Балтина Т.В.[1]

[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[2]Научно-технологический университет «Сириус»,
Федеральная территория Сириус, Россия

Введение. Современные биомедицинские исследования уделяют значительное внимание изучению мышечной атрофии, обусловленной различными факторами, включая пониженную физическую активность, старение и заболевания. Эти состояния выявляются как на микроструктурном уровне, проявляющемся в изменениях обмена веществ, так и макроструктурном через уменьшение массы мышц и трансформацию мышечных волокон [1,2]. Тем не менее, несмотря на клиническое значение, методы лечения мышечной атрофии остаются ограниченными, что подчеркивает необходимость разработки новых подходов.

Цель работы анализ влияния антиортостатического вывешивания, денервации и тенотомии на регулирующие белки в мышцах крысы, такие как дистрофин и нейрональная NO-синтаза (nNOS). Изучение иммуногистохимических изменений в этих белках позволяет глубже понять механизмы мышечной регуляции и адаптации к измененным условиям.

Материалы и методы. В эксперименте использовались особи нелинейных 40 лабораторных крыс массой 170-200 г. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм и одобрены ЛЭК ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» протокол №30 от 28.06.2021 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялись в соответствии с принципами Базельской декларации, требованиями Директивы Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. по защите животных, используемых для научных целей и инструкциях ARRIVE [Directive 2010/63/UE, 2010].

Для обезболивания использовали комбинированный внутримышечный наркоз с использованием золетила («Zoletil 50» «Virbac», Франция), 0.5 мг/кг и ксилазала инъекционного (Xylazalum, «Биогель», Беларусь) 0.05 мл/кг – 0.5 мл/кг. Дозировку подбирали в соответствии с весом экспериментального животного.

Крысы случайным образом были распределены на четыре группы. Первая группа животных подверглась денервации (n=10), вторая – тенотомии (n=10), третья – антиортостатическому вывешиванию (АОВ) (n=10), четвертая – контрольная группа (n=10), не подвергалась вмешательствам.

Тенотомию мышц задней левой конечности у крыс проводили путем иссечения Ахиллова сухожилия [3]. Денервацию проводили путем пережатия седалищного нерва по методике C. De Angelis (1994) [4]. В качестве модели гравитационной разгрузки задних конечностей использовали метод антиортостатического вывешивания (АОВ) по E. R. Morey-Holton в модификации Е.А. Ильина и В.Е. Новикова [5,6].

Животных для гистологической и иммуногистохимической обработки выводили из эксперимента на 7, 14 и 35 сутки путем декапитации на гильотине и последующей перфузией 60 мл натрий-фосфатным буфером (Servicebio, Москва), а затем 50 мл 10% забуференного формалина (Сигма-Мед, Москва).

Для определения повреждения дистрофина и nNOS на микроскопе использовали иммуногистохимические методы. Эти методы основаны на использовании антител, специфически связывающихся с дистрофином и nNOS. Криостатные поперечные серийные срезы камбаловидной (КМ), икроножной мышцы (ИМ) и передней большеберцовой мышцы (ПБМ) окрашивали первичными моноклональными антителам к дистрофину при температуре +4ºС (1:100, Anti-Dystrophin mouse) в течении 12 часов. После чего использовали вторичные антитела (1:200 Anti-mouse 488), конъюгированные с флуорохромом в течение 1 часа при комнатной температуре.

Результаты. Дистрофин – структурный белок, который играет критическую роль в поддержании целостности мышечных волокон. У интактных крыс иммунофлуоресценция дистрофина была обнаружена во всех исследуемых мышцах.

На 7 сутки после АОВ количественный анализ показал снижение уровня дистрофина во всех исследуемых мышцах по сравнению с контрольными значениями (100%) ($p < 0.05$). На 14 сутки в ИМ и ПБМ происходило увеличение на 13.5% и 12.3% соответственно относительно 7 суток, и уменьшение содержания дистрофина в КМ мышце на 13% ($p < 0.05$) (рис. 1А).

На 35 сутки в ИМ и ПБМ относительно 7 суток происходило увеличение на 18.9% ($p > 0.05$), 17.8% ($p > 0,05$) соответственно и уменьшение содержания дистрофина в КМ на 21.1% ($p < 0.01$).

При проведении количественного анализа после тенотомии на 7 сутки, уровень иммунофлуоресценции дистрофина был ниже контрольных значений ($p > 0.05$) (рис. 1Б). На 14 сутки и 35 сутки тенотомии в ИМ, КМ и ПБМ крысы наблюдали уменьшение интенсивности окраски на 12.1%, 14.1%, 6.9% и 17.6%, 18.8%, 11%, соответственно относительно 7 суток и появление мышечных волокон с нарушением дистрофинового слоя. Содержание дистрофина было больше в КМ по сравнению с ИМ и ПБМ, между которыми не было статистически значимых различий.

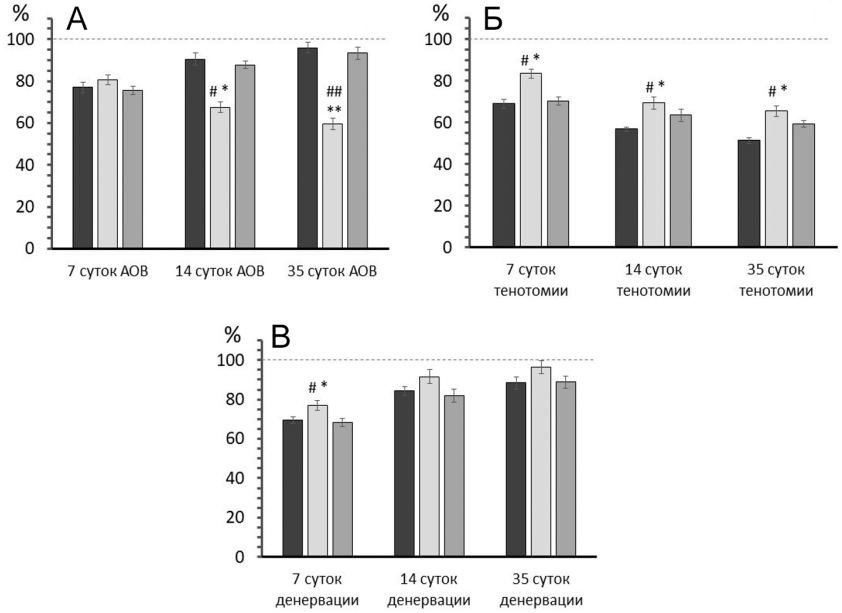


Рис. 1. Содержание дистрофина в икроножной (черный), камбаловидной (светло-серый) и передней большеберцовой (серый) мышцах у крыс на 7, 14 и 35 сутки после антиортостатического вывешивания (А), тенотомии (Б) и денервации (В) относительно диаметра волокон интактных мышц (100%); где * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – достоверность отличий значений камбаловидной мышцы по отношению к икроножной, # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – достоверность отличий значений камбаловидной мышцы по отношению к передней большеберцовой.

Иммунофлуоресценция дистрофина у крыс, подвергшихся денервации, спустя 7 суток, наблюдали уменьшение содержания дистрофина относительно контрольных значений ($p > 0.05$) (рис. 1В). На 14 сутки уровень иммунофлуоресценции дистрофина в ИМ, КМ и ПБМ повысился на 14.8%, 14.7% и 13.7%, соответственно относительно 7 суток. На 35 сутки после денервации экспрессия дистрофина увеличилась в КМ, ИМ и ПБМ на 19.4%, 18.9%, и 20.5%, соответственно. Значимых различий между мышцами не выявлено.

При проведении количественного анализа влияния АОВ на уровень иммуноэкспрессии nNOS было выявлено снижение иммунофлуоресценции в КМ и ИМ ($p < 0.05$) на 7 и 14 сутки (рис. 2А).

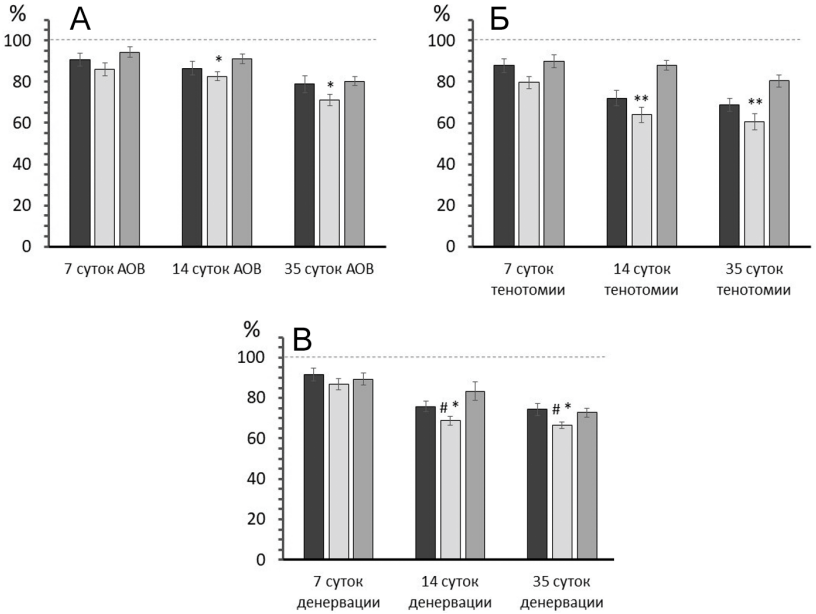


Рис. 2. Содержание nNOS в икроножной (черный), камбаловидной (светло-серый) и передней большеберцовой (серый) мышцах у крыс на 7, 14 и 35 сутки после антиортостатического вывешивания (А), тенотомии (Б) и денервации (В) относительно содержанию nNOS в интактных мышцах (100%). Обозначения как на рисунке 1.

На 35 сутки интенсивность окраски при АОВ в ИМ, КМ и ПБМ снизилась на 12%, 15% и 14%, соответственно, в сравнении с 7 сутками. Наибольшее снижение nNOS отмечено в КМ относительно других мышц и контрольных значений ($p < 0.05$).

На 7 сутки и 14 сутки после тенотомии иммунофлуоресценция nNOS значительно снизилась в КМ и ИМ (рис. 2Б). На 35 сутки после тенотомии наблюдали снижение иммунофлуоресценции nNOS в ИМ, КМ и ПБМ на 19%, 19.1% и 9.5%, соответственно. Наибольшие изменения при тенотомии имели КМ и ИМ крысы ($p < 0.05$).

При денервации на 7 сутки наблюдали снижение иммунофлуоресценции nNOS у крыс в ИМ, КМ и ПБМ на 8.5%, 13.2% и 10.7%, соответственно (рис. 2В). На 14 сутки после денервации иммунофлуоресценция nNOS в ИМ, КМ и ПБМ снизилась на 15.7%, 18% и 6% соответственно относительно 7 суток. На 35 сутки наблюдали

наибольшее снижение иммунофлуоресценции nNOS относительно 7 суток в ИМ, КМ и ПБМ на 17.1%, 20.2% и 16.5%. Максимальное снижение произошло в КМ относительно ИМ и ПБМ ($p < 0.05$).

Вывод. Выявлено, что при денервации увеличивается экспрессия дистрофина, тогда как антиортостатическое вывешивание демонстрирует разнонаправленные эффекты в зависимости от конкретной мышцы. Тенотомия приводит к уменьшению уровня иммуноэкспрессии белка дистрофина в камбаловидной, икроножной и большеберцовой мышцах у крысы. Антиортостатическое вывешивание задних конечностей, денервация и тенотомия приводят к уменьшению уровня содержания белка nNOS в икроножной, камбаловидной и передней большеберцовой, мышцах у крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michael K. Relationship of skeletal muscle atrophy to functional status: A systematic research review. *Biol. Res. Nurs.* 2000;2:117-131.
2. Xi S, Yue S. Research progress of disuse muscle atrophy. *Chin. J. Clin. Rehabil.* 2003;7:710-714.
3. Baltina TV, Eremeev AA, Pleshchinskii IN. The state of the contralateral neuromotor apparatus of the rat in conditions of unilateral tenotomy. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2006;36(4):385-389.
4. De Angelis C, Scarfo C, Falcinelli M, Perna E, Reda E, Ramacci MT, Angelucci L. Acetyl-L-carnitine prevents agedependent structural alterations in rat peripheral nerves and promotes regeneration following sciatic nerve injury in young and senescent rats. *Exp. Neurol.* 1994;128:103-114.
5. Morey-Holton ER. Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness. *BioScience*. 1979;29:168-172.
6. Ильин ЕА, Новиков ВЕ. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами. *Косм. биол. и авиакосм.* мед. 1980;14(3):79-80.

ГАММА-АМИНОМАСЛЯНАЯ КИСЛОТА В МИОГЕНЕЗЕ: ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ

Сибгатуллина Г.В., Токмакова А.Р.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Введение. Живой организм является сложной системой, нормальное функционирование которой зависит от согласованности действия огромного количества регулирующих факторов во времени и пространстве. Понимание процессов регуляции несет не только фундаментальный смысл, но и имеет прикладное значение, поскольку может помочь выявить причины возникновения ряда заболеваний и патологических состояний, что, в свою очередь, поспособствует прогрессу в их терапии.

В процессе образования любой скелетной мышцы основополагающими являются два процесса: деление и слияние [1]. Баланс между ними необходим для правильного формирования окончательных структур мышцы [2,3]. За регулирование такого тонкого баланса на эмбриональном, пренатальном и постнатальном этапах отвечает большое количество позитивных и негативных сигналов. Относительно недавно были получены экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что в процессе миогенеза могут участвовать нейромедиаторы. Так, Лопатиной с соавт. [4] было показано, что ацетилхолин может оказывать стимулирующий эффект на рост эксплантов скелетной мышцы цыпленка. Также и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), которую ранее рассматривали исключительно в качестве одного из основных нейромедиаторов центральной нервной системы, может вносить вклад в регуляцию роста и развития мышечной ткани млекопитающих. Ранее нами было показано, что данная аминокислота обнаруживается в цитоплазме миоцитов и миотрубок *in vitro*. Однако в дальнейшем содержание ГАМК снижается, и в зрелых волокнах она практически не обнаруживается [5]. Также было установлено, что при повышении внеклеточной концентрации ГАМК происходит угнетение процесса слияния миоцитов [6]. При этом было показано, что низкие концентрации экзогенной ГАМК стимулируют, а высокие, наоборот, угнетают процесс деления миоцитов. Таким образом, нами были собраны данные, говорящие об участии ГАМК в процессах развития мышечной ткани. Однако каков же механизм влияния аминокислоты на ранние стадии миогенеза?

Участие ГАМК-транспортеров и рецепторов. Как известно, сигнальная функция ГАМК в ЦНС опосредуется как ее рецепторами, так и транспортерами [7,8]. Достаточно давно было показано, что компоненты ГАМКергической системы существуют и за пределами ЦНС. Например, в культуре миоцитов *Xenopus* были выявлены ионотропные функциональные ГАМКА рецепторы [9]. Проведенные нами исследования показали, что ГАМКА рецепторы отсутствуют на миоцитах, но экспрессируются на миотрубках *in vitro*, тогда как ГАМК-транспортеры были выявлены как на миоцитах, так и на миотрубках [10]. Это дало возможность предположить, что воздействие ГАМК на процессы деления и слияния мышечных клеток может быть опосредовано ГАМК рецепторами и транспортерами. Однако проведенный фармакологический анализ с использованием блокатора ГМАКА-рецепторов габазина показал, что ингибирующее действие ГАМК на процесс образования миотрубок осуществляется не за счет ионотропных ГАМКА рецепторов. При этом эксперименты с ингибитором GAT-2 транспортеров нипекотиновой кислотой показали участие ГАМК транспортеров в реализации тормозящего эффекта экзогенной аминокислоты на слияние миоцитов. После анализа полученных данных, нами было предположено, что в данном случае происходит реверсия транспортеров, и создание определенной концентрации ГАМК внутри клетки имеет определенное значение для процессов, сопровождающих образование миотрубок.

Энергетический метаболизм клетки. Процессы, как деления, так и слияния являются энергозатратными. Ряд авторов отмечает роль ГАМК как промежуточного звена в энергетическом метаболизме [11]. Метаболическая функция ГАМК возникает из связи данной аминокислоты с циклом трикарбоновых кислот [11]. Три фермента в ГАМК-пути обеспечивают реализацию так называемого ГАМК шунта, который обходит два этапа цикла трикарбоновых кислот [12]. Хотя ГАМК сама по себе не может энергетизировать митохондрии [13], в работе Calvalcanti-de-Albuquerque et al. [14] продемонстрировано, что ГАМК шунт усиливает потребление O_2 митохондриями в корковых и гипоталамических синаптосомах. В то же время показано, что экзогенное добавление ГАМК к культурам C2C12 увеличивает экспрессию PGC-1α [15]. PGC-1α, как известно, является одним из основных регуляторов биогенеза митохондрий [16] и обеспечивающим метаболизм и производство энергии в эукариотических клеток [17].

Генетические аспекты. В основе любого процесса лежит экспрессия определенных генов. Регуляция дифференцировки скелетных мышц зависит от целого ряда генов, кодирующих факторы транскрипции. В настоящее время имеется крайне мало работ, посвященных исследованию влияния ГАМК на экспрессию ключевых генов миогенеза.

Тем не менее, уже показано, что экзогенное внесение ГАМК вызывает увеличение уровня экспрессии MyoD и снижение уровня экспрессии миостатина [15]. MyoD является важным транскрипционным фактором в ходе эмбрионального развития скелетных мышц [18], а миостатин, наоборот, выполняет роль негативного регулятора роста и метаболизма мышц [19]. В нашей лаборатории планируется произвести расширенный анализ коэкспрессии генов ГАМКергической системы и ключевых генов миогенеза. В настоящий момент нами проводится подбор праймеров для проведения данного анализа. В качестве ключевых генов, отвечающих за миогенез, нами выбраны такие гены как такие как MyoD, MyoG и Pax7. Сопоставление профилей экспрессии всех этих генов позволит оценить степень участия ГАМК в ранних этапах миогенеза.

Заключение. Исходя из вышеизложенного, ГАМК имеет достаточное количество потенциальных механизмов, вносящих вклад в регуляцию процессов деления и слияния миоцитов. И каждый из них требует детального изучения.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-24-00201.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2012; 1;4(2):a008342.
2. Tatsumi R., Hattori A., Ikeuchi Y. et al. Mol. Biol. Cell. 2002;13: 2909-2918.
3. Buckingham M., Bajard L., Chang T. et al. J. Anat. 2003;202: 59-68.
4. Лопатина ЕВ, Гавриченко АВ, Пасатецкая НА. Участие ацетилхолина и Na+, K+-АТФазы в регуляции роста скелетных мышц куриного эмбриона. Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 2023;109(2):229-40.
5. Sibgatullina GV, Malomouzh AI. GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. Protoplasma. 2020;257(3):1009-1015.
6. Sibgatullina G, Al Ebrahim R, Gilizhdinova K, Tokmakova A, Malomouzh A. Differentiation of myoblasts in culture: focus on serum and GABA. Cells Tissues Organs. 2023;213(3):203-12.
7. Wu C, Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. Metab Brain Dis. 2015;30(2):367-79.
8. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and Glutamate Transporters in Brain. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;11;4:165.
9. Borodinsky LN, Spitzer NC. Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(1):335-40.
10. Токмакова А.Р., Сибгатуллина Г.В., Гилиждинова К.Р., Маломуж А.И. Исследование механизма угнетающего действия гамма-аминомасляной кислоты на процесс образования миотрубок в культуре. Биологические мембраны. 2023; 40(5):388-395.
11. Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. J Neurochem. 1993; 60(2):395-407.

12. Balazs R et al. The operation of the gamma-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. Biochem J. 1970;116(3):445-461.
13. Ravasz D et al. Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation. Neurochem Int. 2017;109:41-53
14. Cavalcanti-de-Albuquerque JP, de-Souza-Ferreira E, de Carvalho D.P. et al. Coupling of GABA metabolism to mitochondrial glucose phosphorylation. Neurochem Res. 2022;47:470-480.
15. Uehara E, Hokazono H. GABA (γ-aminobutyric acid) promotes cell proliferation, increases MyoD and PGC-1α expression, and decreases myostatin expression in C2C12 myoblasts. Int J Food Sci Nutr. 2022;7:8-12.
16. Memme JM, Erlich AT, Phukan G et al. Exercise and mitochondrial health. J Physiol. 2021;599:803-17.
17. Rensvold JW, Shishkova E, Sverchkov Y. Defining mitochondrial protein functions through deep multiomic profiling. Nature. 2022;606:382-8.
18. Shintaku J, Peterson JM, Talbert EE et al. MyoD Regulates Skeletal Muscle Oxidative Metabolism Cooperatively with Alternative NF-kB. Cell Reports. 2016;17:514-26.
19. Wang L, Ma S, Ding Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated MSTN gene editing induced mitochondrial alterations in C2C12 myoblast cells. Electronic Journal of Biotechnology. 2019;40:30-9.

АНТИОКСИДАНТ MITO-TEMPO ВЛИЯЕТ НА АТРОФИЮ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ ПОСЛЕ 7 СУТОК ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

Сидоренко Д.А., Львова И.Д., Шарло К.А.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Введение. Функциональная разгрузка скелетных мышц наблюдается во время космического полёта, длительного постельного режима или иммобилизации конечности. При этом развивается атрофия скелетных мышц, что является серьёзным последствием для здоровья и ощутимым снижением качества жизни. Кроме того, во время функциональной разгрузки наблюдается дисфункция митохондрий и повышается выброс митохондриями активных форм кислорода (АФК) (Trevino et al., 2019). Известно, что некоторые антиоксиданты способны облегчать проявление атрофии во время функциональной разгрузки (Appell et al., 1997; Min et al., 2011). Введение на ранних сроках функциональной разгрузки (6 часов) специфического для митохондрий антиоксиданта Mito-TEMPO, привело к снижению транслокации в ядро ключевого транскрипционного фактора протеолиза FOXO (Lechado i Terradas et al., 2018). Но на более поздних стадиях влияние Mito-TEMPO на анаболические и катаболические параметры не изучено.

Мы предположили, что Mito-TEMPO заблокирует накопление митохондриальных АФК, что приведёт к увеличению экспрессии мРНК MuRF-1, а также предотвратит снижение анаболических параметров во время 7-суточной функциональной разгрузки, что в совокупности может повлиять на атрофию.

Методы. Работа была проведена на самцах крыс Wistar возрастом 2,5 месяца и весом 180-200 граммов.

Животные были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой. С – виварный контроль; 7HS – 7-суточное вывешивание с внутрибрюшинным введением физиологического раствора; 7HS+M – 7-суточное вывешивание с ежедневным внутрибрюшинным введением миметика супероксиддисмутазы Mito-TEMPO (1 мг/кг). Препарат был разведён в 1% ДМСО в физиологическом растворе, такая же дозировка использовалась ранее (Lechado i Terradas et al., 2018).

Для моделирования функциональной разгрузки мышц задних конечностей мы использовали методику антиортостатического вывешивания задних конечностей грызунов по Ильину-Новикову в модификации Морей-Холтон (Е.А. Ильин, Новиков, 1980; Morey-Holton, Globus, 2002).

После эксперимента у животных под бромэтанольным наркозом извлекались камбаловидные мышцы (*m.soleus)*, затем животное эвтаназировали методом цервикальной дислокации. Полученные мышцы использовали для иммуногистохимического анализа, выделения белка с последующим электрофорезом в агарозном геле и Вестерн-блоттингом, а также для выделения РНК, обратной транскрипции и проведения ПЦР в реальном времени.

Результаты. После 7-суточного вывешивания задних конечностей крыс в группе 7HS доля окисленного тропомиозина увеличилась вдвое по сравнению с группой С. В группе 7HS+M уровень окисленного тропомиозина был значительно ниже значений группы 7HS и не отличался от контрольной группы

Кроме того, в группе 7HS произошло достоверное снижение площади поперечного сечения (ППС) как быстрых, так и медленных мышечных волокон. В группе 7HS+M ППС быстрых и медленных мышечных волокон не отличалась от группы С. Также, в группе 7HS в *m.soleus* достоверно выше содержание быстрых мышечных волокон и ниже содержание медленных мышечных волокон по сравнению с группой С. В то время как в группе 7HS+M содержание быстрых мышечных волокон достоверно ниже, а медленных выше, чем в группе 7HS и не отличается от группы С. В группе 7HS достоверно снижается содержание 18S и 28S рРНК, по сравнению с группой С. В группе 7HS+M содержание 18S и 28S рРНК не отличается ни от группы С, ни от группы 7HS. В группе 7HS уровень фосфорилирования p70s6k достоверно ниже, чем в группе С, а в группе 7HS+M нет отличий от группы С и от группы 7HS. Содержание мРНК маркёра протеолиза убиквитин лигазы MuRF-1 в группе 7HS вдвое больше, чем в группе С, группа 7HS+M не имеет достоверных отличий от группы С и 7HS. Содержание мРНК убиквитин лигазы Atrogin достоверно выше в группе 7HS, по сравнению с С. В группе 7HS+M содержание мРНК Atrogin достоверно ниже, чем в группе 7HS, но в то же время достоверно выше, чем в группе С.

Обсуждение. Введение Mito-TEMPO, специфического для митохондрий антиоксиданта предотвратило окисление тропомиозина во время 7-суточного вывешивания. Поскольку окисленный тропомиозин отражает уровень АФК в мышце, можно сделать вывод, что введение Mito-TEMPO снизило накопление АФК.

После 7-суточной функциональной разгрузки в камбаловидной мышце крысы снизилась ППС мышечных волокон и произошла трансформация миозинового фенотипа в «быструю» сторону. Полученные результаты согласуются с ранее известными изменениями в соотношении и ППС мышечных волокон после 7 суток антиортостатического вывешивания (Templeton et al., 1988; Thomason, Booth, 1990).

Антиоксидант Mito-TEMPO полностью предотвращает изменения соотношения мышечных волокон, и частично предотвращает снижение ППС мышечных волокон обоих типов после 7-суточного вывешивания.

Частичное предотвращение атрофии мышечных волокон с помощью Mito-TEMPO может быть связано с АФК-зависимой инактивацией протеолиза (Vitadello et al., 2014; Lechado i Terradas et al., 2018). В условиях функциональной разгрузки одним из ключевых механизмов, обеспечивающих увеличение протеолиза, является экспрессия убиквитин лигазы MuRF-1, и, в меньше степени, рост экспрессии Atrogin-1 (Bodine et al., 2001). В нашем исследовании после 7-суток вывешивания содержание мРНК убиквитинлигаз MuRF-1 и Atrogin выросло, что согласуется с литературными данными (Baehr et al., 2017). Мы показали, что введение Mito-Tempo на фоне 7-дневной функциональной разгрузки задних конечностей крыс привело к частичному снижению мРНК убиквитинлигаз MuRF-1 и Atrogin. Из чего следует, что накопление митохондриальных АФК в камбаловидной мышце крысы во время 7-суточного вывешивания может приводить к повышению экспрессии мРНК убиквитинлигаз MuRF-1 и Atrogin, что ведёт к росту протеолиза и, как следствие, к атрофии.

Под влиянием Mito-TEMPO произошло также частичное предотвращение снижения содержания рибосомальных РНК, от которых зависит трансляционная ёмкость (Millward et al., 1973).

Хорошо известно, что протеинкиназа mTORC1 участвует в регуляции скорости синтеза белка путём фосфорилирования нижестоящих мишеней p70s6k и 4E-BP1 (Kimball, Jefferson, 2010). Введение Mito-TEMPO нашем исследовании предотвратило снижение уровня фосфорилирования p70s6k, которое достоверно понизилось в группе 7HS. Из литературы известно, что в мышце АФК тормозят активность mTOR (Powers, Schrager, 2022). Поэтому скорее всего митохондриальные АФК, которые накапливаются в *m.soleus* крысы во время 7-суточного вывешивания задних конечностей влияют на трансляционную ёмкость через снижение активности mTORC1.

Таким образом, можно предположить, что накопление митохондриальных АФК в камбаловидной мышце во время 7-суточного вывешивания задних конечностей крыс влияет как на синтез, так и на распад белка, что выражается в снижении ППС мышечных волокон в камбаловидной мышце крысы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Appell H.J., Duarte J.A.R., Soares J.M.C. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy // Int. J. Sports Med. 1997. V. 18. № 3. - P. 157–160.
2. Baehr L.M., West D.W.D., Marshall A.G., Marcotte G.R., Baar K., Bodine S.C. Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats // J. Appl. Physiol. 2017. V. 122. № 5. - P. 1336–1350.
3. Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K.M., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Erqian Na, Dharmarajan K., Pan Z.Q., Valenzuela D.M., Dechiara T.M., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal Muscle Atrophy // Science (80-.). 2001. V. 294. № 5547. - P. 1704–1708.
4. Kimball S.R., Jefferson L.S. Control of Translation Initiation through Integration of Signals Generated by Hormones, Nutrients, and Exercise // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 38. - P. 29027.
5. Lechado i Terradas A., Vitadello M., Traini L., Namuduri A.V., Gastaldello S., Gorza L. Sarcolemmal loss of active nNOS (Nos1) is an oxidative stress-dependent, early event driving disuse atrophy // J. Pathol. 2018. V. 246. № 4. - P. 433–446.
6. Millward D.J., Garlick P.J., James W.P.T., Nnanyelugo D.O., Ryatt J.S. Relationship between Protein Synthesis and RNA Content in Skeletal Muscle // Nat. 1973 2415386. 1973. V. 241. № 5386. - P. 204–205.
7. Min K., Smuder A.J., Kwon O.S., Kavazis A.N., Szeto H.H., Powers S.K. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy // J. Appl. Physiol. 2011. V. 111. № 5. - P. 1459–1466.
8. Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. № 4. - P. 1367–1377.
9. Powers S.K., Schrager M. Redox signaling regulates skeletal muscle remodeling in response to exercise and prolonged inactivity // Redox Biol. 2022. V. 54. - P. 102374.
10. Templeton G.H., Sweeney H.L., Timson B.F., Padalino M., Dudenhoeffer G.A. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension // J. Appl. Physiol. 1988. V. 65. № 3. - P. 1191–1195.
11. Thomason D.B., Booth F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting // https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.1.1. 1990. V. 68. № 1. - P. 1–12.
12. Trevino M.B., Zhang X., Standley R.A., Wang M., Han X., Reis F.C.G., Periasamy M., Yu G., Kelly D.P., Goodpaster B.H., Vega R.B., Coen P.M. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy // Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 2019. V. 317. № 5. - P. E899–E910.
13. Vitadello M., Germinario E., Ravara B., Libera L.D., Danieli-Betto D., Gorza L. Curcumin counteracts loss of force and atrophy of hindlimb unloaded rat soleus by hampering neuronal nitric oxide synthase untethering from sarcolemma // J. Physiol. 2014. V. 592. № 12. - P. 2637–2652.
14. Е. А. Ильин, Новиков В.Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях // Косм. биол. мед. 1980. V. 14. № 3. - P. 79–80.

ВКЛАД КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ А2 В ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПАЛЬМИТОИЛКАРНИТИНА НА КАРДИОМИОЦИТЫ

Цай А.А.[1], Дынник В.В.[2], Пименов О.Ю.[2], Федотова Е.И.[1], Бережнов А.В.[1]

[1]Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

Введение. Известно, что при острых расстройствах, таких как ишемия-реперфузия, происходит резкое увеличение уровня жирных кислот в очаге поражения [1]. При этом жирные кислоты и их активированные производные накапливаются и оказывают токсическое действие на кардиомиоциты (КМЦ). Ранее нами было показано при измерении уровня цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$), что добавление к изолированным КМЦ пальмитоилкарнитина (РС) в концентрациях порядка 10-20 мкМ приводит к гибели клеток после лаг-фазы, длящейся несколько минут. Во время лаг-фазы не наблюдается заметного увеличения $[Ca^{2+}]_i$, однако затем происходит резкий подъем $[Ca^{2+}]_i$, гиперсокращение КМЦ с последующим нарушением проницаемости плазмалеммы, регистрируемым по выходу флуоресцентного зонда во внеклеточный раствор [2]. Несмотря на в общем неизменный уровень $[Ca^{2+}]_i$ во время лаг-фазы, нами было обнаружено формирование устойчивых микродоменов с высоким уровнем Ca^{2+} в КМЦ. В течение лаг-фазы происходит перераспределение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) в митохондрии (МХ) и активация ряда фосфолипаз [3,4]. Длительность лаг-фазы зависит от кальций-буферной емкости МХ, а предотвращение транспорта Ca^{2+} в МХ приводит к полному исчезновению лаг-фазы. Таким образом, МХ играют роль буфера Ca^{2+}, освобождающегося из запасов СР при действии РС или МС.

При исследованиях на изолированных митохондриях было показано, что последовательные добавки РС вызывают индукцию циклоспорин А-чувствительной поры mPTP при достижении концентрации РС 60 мкМ. Применение ингибиторов кальций-независимой фосфолипазы А2 (iPLA2) BEL и PACOCF3 оказывают защитный эффект, увеличивая кальций-буферную емкость МХ в присутствии РС [5].

В данной работе мы предприняли попытку оценить вклад iPLA2 и продуктов метаболизма арахидоновой кислоты в токсический эффект PC на изолированные кардиомиоциты.

Методы. Кардиомиоциты были получены из левых желудочков сердца крыс Spraque Dowley по методу, описанному в [6]. Для регистрации $[Ca^{2+}]_i$ с помощью системы анализа изображений или конфокального микроскопа кардиомиоциты нагружали 5 мкМ Fura-2AM или 5 мкМ Fluo-8AM соответственно. После окрашивания (37°C, 40 мин) клетки отмывали в течение 10 мин раствором Хенкса без красителя и использовали в эксперименте в течение 2 ч.

Регистрация уровня внутриклеточного Ca^{2+}. Эксперименты проводили с помощью флуоресцентной станции на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного монохромной камерой Hamamatsu Orca-R2 и системой высокоскоростной смены возбуждающих свето фильтров Ludl MAC5000. Получали серии изображений кардиомиоцитов с интервалом 5 с. Серии изображений анализировали с помощью ImageJ. В эксперименте определяли время от момента добавки PC (20 мкМ) до наступления гиперконтрактуры кардиомитоцита, когда видимая ширина клетки превышает ее длину. *Регистрацию Ca^{2+}-волн и спарков* проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (“Leica Microsystems”, Германия). Получали изображения кардиомиоцитов, нагруженных Fluo-8, в режиме XT с частотой 400 линий в секунду.

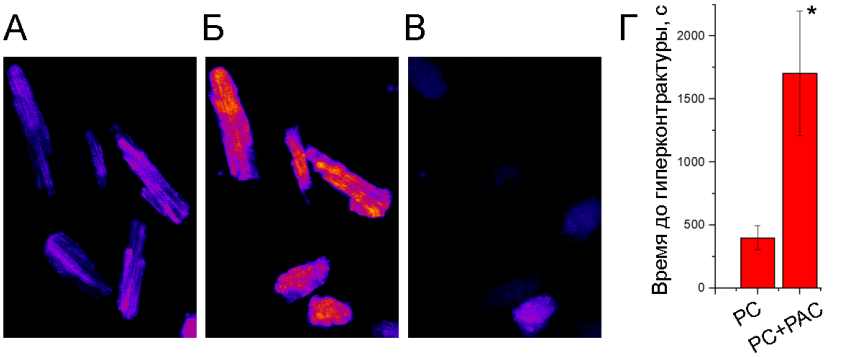


Рис. 1. А. Изображения кардимиоцитов (Fura-2, канал 340) непосредственно после (А) через 6 (Б) и 12 минут после добавления 20 мкМ PC. Г – влияние ингибитора iPLA2 PACOCF3 (PAC, 32 мкМ, предынкубация 3 минуты) на время от добавки 20 мкМ PC до наступления гиперконтрактуры. * – $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что применение ингибиторов iPLA2γ – PACOCF3 (32 мкМ) и BEL (25 мкМ), вызывало увеличение времени от

введения PC (20 мкМ) до наступления гиперконтрактуры (рис. 1). В наших экспериментах защитный эффект также оказали ингибиторы превращения арахидоновой кислоты, а именно ингибиторы липоксигеназы (LOG) – NDGA (2 мкМ) и ML 355 (3 мкМ).

Применение PACOCF3 приводило к снижению образования микродоменов с высоким уровнем Ca^{2+} в КМЦ (рис. 2), по-видимому за счет увеличения Ca^{2+}-буферной емкости МХ.

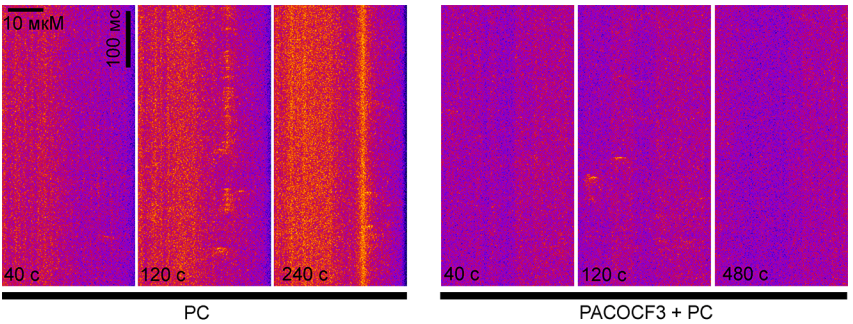


Рис. 2. Конфокальные изображения КМЦ, полученные в режиме XT (по горизонтали – продольная ось КМЦ, по вертикали – время). Указано время после добавки 10 мкМ PC. Слева – действие PC. справа – действие PC на фоне 32 мкМ PACOCF3 (предынкубация 3 мин до добавки PC).

Таким образом iPLA2 является ключевым ферментом, который опосредует токсический эффект длинноцепочечных ацилкарнитинов на кардиомиоциты.

Работа выполнена в рамках Госзадания ФИЦ ПНЦБИ РАН 075-01512-22-02 (№ 1022080100047-5-1.6.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Volska K. et al. // Biochem J. 2016. 473(9): 1191-202.
2. Бережнов А.В., Федотова Е.И., Ненов М.Н. и др. // Биофизика. 2008. 53(6): 1025-32.
2. Бережнов А.В., Федотова Е.И., Ненов М.Н. и др. // В сб. Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Под редакцией В.П. Зинченко. 2007. С. 9-12.
3. Бережнов А.В., Федотова Е.И., Ненов М.Н. и др. // Биологические мембраны. 2010. 27(1): 67-76.
4. Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Nenov M.N. et al. // IJMS. 2020. V. 21: 7461.
5. Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынник В.В. // Биологические мембраны. 2023. 40(5): 396-403.
6. Alekseev A.E., Jovanovic A., Lopez J.R., Terzic A. // J. Mol. Cell Cardiol. 1996. 28(6): 1193-202.

НАРУШЕНИЕ РАННЕГО ФОСФОПРОТЕОМНОГО ОТВЕТА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ НА ПРИЕМ ПИЩИ ПРИ ОЖИРЕНИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Якупова Э.И.[1], Леднев Е.М.[1,2], Подкуйченко Н.В.[1,3], Верпхвадзе Т.Ф.[1], Смирнов И.П.[4], Згода В.Г.[5], Вавилов Н.Э.[5], Томилова А.О.[2], Воротников А.В.[3], Шестакова М.В.[2], Попов Д.В.[1]

[1]ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
[2]НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия
[3]НМИЦ кардиологии Минздрава России, Москва, Россия
[4]ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия
[5]НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Введение. Ожирение является основной причиной развития сахарного диабета 2 типа (СД2Т) – формы диабета, связанной с наличием резистентности к инсулину (ИР) тканей и увеличением уровня глюкозы крови натощак [1,2]. СД2Т страдают 462 миллиона (более 6%) человек в мире, ежегодная смертностью составляет более 1 миллиона человек; эта патология входит в десятку наиболее социально значимых заболеваний [3]. Скелетные мышцы отвечают за 80% инсулинозависимого захвата глюкозы из кровотока [4]. Однако вызванные СД2Т нарушения в инсулинозависимой сигнализации в скелетной мышце человека до сих пор остаются предметом дискуссий [5] и активного поиска [6].

Используя широкозахватный метод фосфопротеомного масс-спектрометрического анализа было показано, что в скелетной мышце людей с инсулинорезистентностью инсулин (гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест; концентрация в крови 100 мМЕ/л или ~0,6 нМ) вызывает изменение фосфорилирования белков канонического инсулинового сигнального пути сопоставимое со здоровым контролем [7]. Это согласуется с работами на грызунах с вызванной инсулинорезистентностью [8]. Нужно отметить, что амплитуда инсулинового ответа на прием пищи значительно различаться у здоровых людей и пациентов с инсулинорезистентностью и, особенно, с СД2Т.

Настоящая работа посвящена исследованию раннего фосфопротемного ответа скелетных мышц пациентов с ожирением и СД2Т при моделировании естественного приема пищи.

Материалы и методы. Пробы *m. vastus lateralis* (игольчатая биопсия под местной анестезией) и образцы венозной крови брали у 8 здоровых добровольцев (индекс массы тела (ИМТ) ~23 кг/м^2) и 8 пациентов с ожирением и СД2Т (ИМТ ~40 кг/м^2) натощак и через 1 ч после

приема смешанной пищи (6 ккал/кг массы тела). В крови оценивали содержание глюкозы и инсулина. Из биопсических образцов выделяли белки, проводили их гидролиз. Пептиды метили изобарическими изотопными метками и затем проводили обогащение фосфопептидов с помощью TiO_2 бус. После фракционирования образцы анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Уровень фосфорилирования отдельных сайтов ключевых белков канонического инсулинового каскада (AKT и TBC1D4) был оценен с помощью Вестерн-блот анализа.

Результаты и обсуждение. У здоровых добровольцев через час после приема пищи уровень инсулина крови увеличился до 30 мМЕ/л, а у пациентов до 112 мМЕ/л. У пациентов, несмотря на выраженный ответ, наблюдалось повышенное постпрандиальное содержание глюкозы крови (12,5 ммоль/л, против 5 ммоль/л у здоровых), что свидетельствует о выраженной инсулинорезистентности и нарушении углеводного обмена.

Было детектировано около 4,5 тысяч фосфопептидов. У здоровых людей прием пищи вызывал изменения фосфорилирования нескольких десятков фосфосайтов, в частности, сайтов белков канонического инсулинового каскада (AKT – ключевая киназа этого каскада, ряд ее субстратов: TBC1D4 – основной регулятор транслокации GLUT4-содержащих везикул на клеточную мембрану, и AKT1S1), а также ряд мишеней киназы MTOR1 (4EBP1, RPS6).

У пациентов с СД2Т, несмотря на значительно увеличенный постпрандиальный уровень инсулина в крови (более чем в 3 раза), не было найдено выраженных изменений фосфопротеома, в частности, белков канонического инсулинового каскада.

Результаты масс-спектрометрического фосфопротеомного анализа были сопоставлены с данными Вестерн-блот анализа для фосфосайтов: TBC1D4 Ser318, AKT Ser473, RPS6 Ser235/Ser236.

Работы с участием пациентов с инсулинорезистентностью и на грызунах с вызванной инсулинорезистентностью показали отсутствие нарушений фосфорилирования белков канонического сигнального каскада в скелетной мышце после стимуляции инсулином [7,8]. Результаты нашей работы свидетельствуют, что эти нарушения происходят при дальнейшем развитии инсулинорезистентности. Так, у пациентов с СД2Т наблюдалось выраженное подавление постпрандиального фосфопротеомного ответа скелетной мышцы, в частности, отсутствие ответа белков канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы. Важно подчеркнуть, что подавление фосфопротеомного ответа у пациентов, по сравнению с здоровым контролем, наблюдалось несмотря на значительно увеличенный постпрандиальный уровень инсулина в крови.

Выводы. У пациентов с ожирением и СД2Т ранний фосфопотеомный ответ на прием пищи подавлен по сравнению со

здоровыми людьми, несмотря на значительно более выраженное увеличение содержание инсулина в крови. Отсутствие ответа может быть связано не только с инсулинорезистентностью (нарушение активации канонического инсулинового каскада), но и с ранним временем взятия биопсических проб (1 ч после еды).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (№ 25-25-20099).

ЛИТЕРАТУРА

1. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. J Clin Invest, 2016. 126(1): p. 12-22.
2. Shestakova, M.V., et al., [Obesity and diabetes - are they always together?]. Ter Arkh, 2022. 94(10): p. 1131-1135.
3. Khan, M.A.B., et al., Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. J Epidemiol Glob Health, 2020. 10(1): p. 107-111.
4. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. Diabetes Care, 2009. 32 Suppl 2(Suppl 2): p. S157-163.
5. James, D.E., J. Stockli, and M.J. Birnbaum, The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. 22(11): p. 751-771.
6. Batista, T.M., N. Haider, and C.R. Kahn, Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. Diabetologia, 2021. 64(5): p. 994-1006.
7. Needham, E.J., et al., Personalized phosphoproteomics of skeletal muscle insulin resistance and exercise links MINDY1 to insulin action. Cell Metab, 2024. 36(12): p. 2542-2559 e2546.
8. Small, L., et al., Reduced insulin action in muscle of high fat diet rats over the diurnal cycle is not associated with defective insulin signaling. Mol Metab, 2019. 25: p. 107-118.

Посттрансляционные модификации в регуляции внутриклеточных процессов

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ p53 В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Батальщикова С.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Инсульт занимает 2 место в мире по смертности от заболеваний после сердечно-сосудистых заболеваний [1]. В случае ишемического инсульта, который составляет около 80% всех случаев инсультов, происходит блокировка церебральных артерий тромбом, атеросклеротической бляшкой, спазмом или резким изменением артериального давления, что приводит к резкому снижению или прекращению кровоснабжения мозговых тканей. После возникновения ишемического инсульта повреждение клеток распространяется из области инфаркта в окружающие ткани, что называется полутенью. В этих поврежденных тканях происходит активация процессов регенерации, однако большая часть клеток в зоне пенумбры погибает преимущественно по пути апоптоза, а не некроза. Поэтому для улучшения процесса восстановления после инсульта важно найти методы предотвращения апоптоза клеток [2]. Протеомный анализ экспрессии более 700 белков в клетках перифокальной зоны фототромботического инсульта (ФТИ) позволил выявить глобальные регуляторы апоптоза, такие как транскрипционные факторы p53, c-Myc и E2F1 [3]. В нормальных нейронах уровень p53 не является высоким [4]. Однако церебральная ишемия приводит к быстрому увеличению уровня p53 и активации апоптоза клеток пенумбры [5]. Ряд исследований на онкотрансформированных клетках показывает, что ацетилирование p53 по лизинам 372, 373, 381 и 382 (C-концевой домен), как правило, увеличивает стабильность и активность белка, что повышает чувствительность раковых клеток к стрессу [6]. В культурах корковых нейронов было показано, что ацетилирование p53 в C-концевом домене усиливает апоптоз нейронов после воздействия различных клеточных стрессоров. Напротив, в клетках карциномы лёгких было показано, что ацетилирование по лизину 320 способствует выживанию клеток после повреждения ДНК [7]. В настоящее время существует мало in vivo-исследований, посвящённых природе изменений ацетилирования p53 после церебральной ишемии.

Ранее в модели глобальной ишемии было показано, что p53 подвергается усиленному ацетилированию по позициям K373 и K382 в клетках CA1 гиппокампа крысы, что увеличивает стабильность и проапоптотическую активность p53 [8]. В модели ФТИ были исследованы изменения уровня ацетилирования лизинов p53 в позициях K120, K320, K373 и K382 в разные сроки после облучения.

Материалы и методы. В качестве модельных животных использовали взрослых самцов крыс линии Wistar. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Для моделирования ишемического инсульта применяли односторонний ФТИ в соматосенсорной коре крыс и мышей. После окончания эксперимента крыс декапитировали через 4 или 24 часа, либо через 7 дней после ФТИ. Контрольные группы включали животных, перенесших аналогичные хирургические процедуры, но без введения фотосенсибилизатора. Для оценки экспрессии и распределения p53 и его ацетилированных форм в перифокальных клетках ФТИ использовали метод двойной иммунофлуоресценции. Апоптотические клетки визуализировали методом TUNEL, данные подтверждались вестерн-блот анализом. Был проведен статистический анализ. Молекулярная динамическая симуляция (МДС) проводилась с использованием Gromacs 2022.3.

Результаты. С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии была оценена интенсивность флуоресценции антител к p53 и его ко-локализация с маркерами нейронов, астроцитов, макрофагов и микроглии. В корковых клетках животных в контрольной группе уровень экспрессии p53 был низким, через 4 часа после ФТИ его уровень в пенумбре увеличился почти в два раза и оставался высоким в течение 7 дней, после чего значительно снизился и вернулся к контрольным значениям. Такие изменения происходили как в ядре клетки, так и в цитоплазме. Данные подтвердились вестерн-блот анализом.

Согласно данным вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии, значительных изменений уровня ацетилирования p53 по K120 (p53AcK120) в перифокальных клетках в различные временные промежутки после ФТИ не наблюдалось. Известно, что p53, ацетилированный по K120, может присутствовать в митохондриях раковых клеток, а увеличение ацетилирования p53 в K120 усиливает как транскрипционно-зависимый, так и транскрипционно-независимый апоптоз [9]. Однако в кортикальных нейронах крысы p53AcK120 преимущественно локализовался в ядрах нейронов, но не в цитоплазме.

Лизин в положении 320 расположен в гибком линкерном домене рядом с TET-доменом, который также содержит сигнал ядерной локализации [10]. Согласно данным вестерн-блоттинга, в течение первых суток после ФТИ наблюдается почти трехкратное снижение уровня p53AcK320 в ядерной фракции пенумбры и увеличение его уровня в цитоплазме (рис. 1). Эта тенденция сохранялась до 7 дней после ФТИ. В то же время данные иммунофлуоресцентной микроскопии показали увеличение содержания p53AcK320 в нейронах в эти периоды (рис. 1).

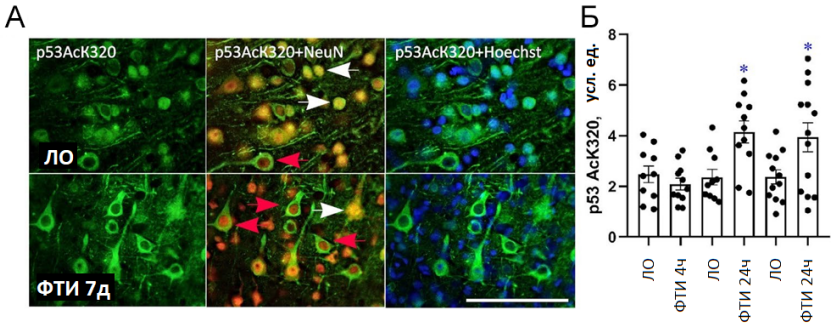


Рис. 1. Изменения уровня ацетилирования p53 по лизину 320 в коре головного мозга у ложнооперированных (ЛО) крыс и в периинфарктной области после фототромботического инсульта через 4 ч (ФТИ 4ч), 24 ч (ФТИ 24ч) и 7 дней (ФТИ 7д) после облучения. А – Иммуннофлуоресценция p53AcK320 (зелёный), наложение изображения p53AcK320 с NeuN (нейрональный маркёр, красный) и Hoechst 33342 (ядерный маркёр, синий). Шкала: 100 мкм. Белыми стрелками указаны нейроны с p53AcK320 в ядрах, красными стрелками – нейроны с p53AcK320 в цитоплазме. Б – Изменения уровня иммуннофлуоресценции p53, ацетилированного по лизину 320, в относительных единицах в клетках периинфарктной зоны в различные сроки после фототромбоза и в коре головного мозга ложнооперированных крыс. n = 8-13. *p < 0.05 по сравнению с ЛО.

По данным вестерн-блоттинга, увеличение ацетилирования p53 по K373 (p53AcK373) наблюдалось в первые сутки после ФТИ как в ядрах, так и в цитоплазме клеток перифокальной зоны коры крысы. Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что p53AcK373 преимущественно локализуется в нейрональных ядрах (рис. 2), причем его уровень увеличился более чем в 3 раза через 24 часа после ФТИ.

p53, ацетилированный по K382, преимущественно локализуется в ядрах нейронов. Согласно данным вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного анализа, повышение уровня p53AcK382 наблюдалось в ранний восстановительный период (на 7-й день после ФТИ), но не в первые сутки после ФТИ.

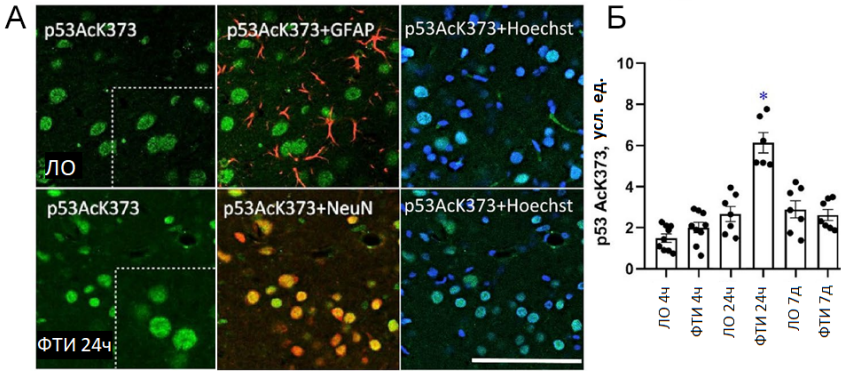


Рис. 2. Изменения уровня ацетилирования p53 по лизину 373 в коре головного мозга крыс после моделирования фототромбоза (ФТИ) и у ложнооперированных животных (ЛО). А – Иммунофлуоресценция p53AcK373 (зелёный), маркёра нейронов NeuN (красный) и маркёра астроцитов GFAP (красный). Шкала 100 мкм. Вставка: увеличенное изображение, шкала 20 мкм. Б – Локализация p53AcK373 в нейронах перифокальной зоны после ФТИ. n = 6-8. *p < 0.05 по сравнению с ЛО.

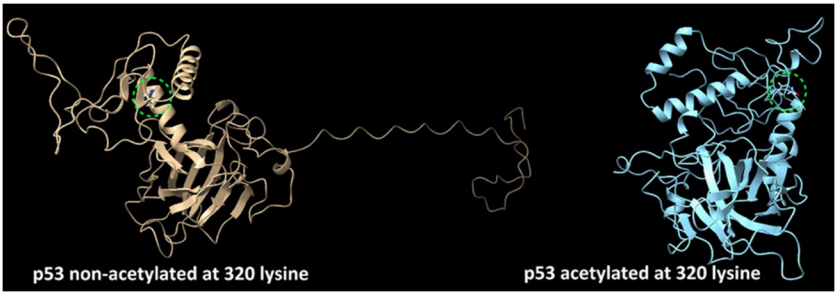


Рис. 3. Результат моделирования методом МДС структуры p53 с неацетилированным (жёлтый цвет) и ацетилированным (синий цвет) лизином 320. Сам лизин показан зелёным в обеих формах.

Моделирование молекулярной динамики показало, что основное различие в конформациях ацетилированного и неацетилированного фрагмента p53 в положении лизина 320 заключается в более компактной структуре ацетилированного фрагмента (рис. 3). По-видимому, ацетильная группа в этом участке способствует формированию гидрофобного домена, который направляет уплотнение свободных пептидных цепей. Напротив, фрагмент без ацетилирования в позиции K320 демонстрирует хаотичное

расположение пептидных цепей по отношению к структурированному домену с α-спиралями. Вероятно, ацетильная группа лизина 320 служит своего рода «двигателем», направляющим процесс компактизации. Возможно, более компактная конформация p53, формирующаяся после ацетилирования по K320 при ФТИ, позволяет белку перемещаться между ядром и цитоплазмой в нейронах пенумбры. В то же время ацетилирование p53 по лизину 373 не вызывает существенных изменений в конформационных предпочтениях С-концевого фрагмента p53, что, вероятно, связано с его функцией связывания с регуляторными участками ферментов или другими вспомогательными белками.

Заключение. Согласно данным вестерн-блот анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии, значительных изменений уровня ацетилирования p53 по K120 и K382 в клетках периинфарктной зоны как в первый день после ФТИ, так и в восстановительный период не наблюдалось. В то же время результаты вестерн-блот анализа показали, что в первый день после ФТИ наблюдается почти трёхкратное снижение уровня ацетилирования p53 по K320 в ядерной фракции ткани пенумбры и повышение уровня p53AcK320 в цитоплазме. Эта тенденция сохраняется до 7 дней после ФТИ. При этом, согласно данным иммунофлуоресцентной микроскопии, общее содержание p53AcK320 в нейронах увеличивается в эти периоды. В первый день после инсульта также наблюдается повышение ацетилирования p53 по K373, преимущественно в ядрах нейронов периинфарктной зоны при ФТИ (рис. 3). Ацетилирование p53 по K320 связано с его транслокацией в цитоплазму нейронов и обратном перемещением в ядро после инсульта.

Работа выполнена при поддержке гранта от Министерства науки и высшего образования РФ FENW-2023-0018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Towfighi A., Saver J. L. Stroke declines from third to fourth leading cause of death in the United States: historical perspective and challenges ahead //Stroke. – 2011. – Т. 42. – №. 8. – С. 2351-2355.
2. Arboix A. et al. Hematological disorders: a commonly unrecognized cause of acute stroke //Expert review of Hematology. – 2016. – V. 9. – №. 9. – P. 891-901.
3. Demyanenko S., Uzdensky A. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex //Molecular neurobiology. – 2017. – Т. 54. – С. 6839-6856.
4. Wu A. et al. Deltamethrin induces altered expression of P53, Bax and Bcl-2 in rat brain //Neuroscience letters. – 2000. – Т. 284. – №. 1-2. – С. 29-32.
5. Uzdensky A. B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro-and antiapoptotic proteins //Apoptosis. – 2019. – Т. 24. – №. 9. – С. 687-702.

6. Mrakovcic M. et al. Epigenetic targeting of autophagy via HDAC inhibition in tumor cells: role of p53 //International journal of molecular sciences. – 2018. – Т. 19. – №. 12. – С. 3952.
7. Knights C. D. et al. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate //The Journal of cell biology. – 2006. – Т. 173. – №. 4. – С. 533-544.
8. Raz L. et al. Acetylation of the pro-apoptotic factor, p53 in the hippocampus following cerebral ischemia and modulation by estrogen //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 10. – С. e27039.
9. Sykes S. M. et al. Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53 //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Т. 284. – №. 30. – С. 20197-20205.
10. Joerger A. C., Fersht A. R. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches //Annual review of biochemistry. – 2016. – Т. 85. – №. 1. – С. 375-404.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ МИШЕНЕЙ АПТАМЕРОВ К ГЛИОБЛАСТОМЕ КАК МАРКЕР КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Глазырин Ю.Е.[1,2], Замай Т.Н.[1,2], Кичкайло А.С.[1,2]

[1]Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

Введение. Маркерами канцерогенеза в организме могут выступать как изменения уровня трансляции определенных клеточных белков, выраженные в увеличенном количестве копий, обнаруживаемых в организме и отражающие повышенную пролиферацию патологических клеток [1], так и присутствие определенных посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков, которые можно определить в качестве признаков онкогенеза [2]. Аптамеры являются синтетическими олигонуклеотидами, специфически подобранными для связывания с определенными клеточными мишеням [3]. Аптамеры, проявляющие высокую аффинность к раковым клеткам, могут быть использованы для выявления новых биомаркеров заболеваний [4]. Белковые клеточные мишени аптамеров могут иметь ряд посттрансляционных модификаций, вероятно определяющих специфическое связывание аптамеров с патологическими клетками. При определении белковых мишеней аптамера Gli-233, ранее подобранного к клеткам глиобластомы [5], были выявлены посттрансляционные модификации глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и альфа-С цепи тубулина (TUBA1C). Вероятное отношение этих ПТМ к канцерогенезу было отмечено в литературе [6].

Материалы и методы. Аптамер Gli-233 был подобран ранее путем селекции к пост-операционным тканям глиальной опухоли мозга человека [5]. Аффинное выделение белковых мишеней аптамеров проводили путем инкубации клеточного лизата с биотинилированными аптамерами, зафиксированными на поверхности стрептавидиновых магнитных микрочастиц [7]. В качестве контроля вместо аптамера использовали неспецифическую последовательность нуклеотидов аналогичной длины. Масс-спектрометрический анализ выделенных белков проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Thermo Orbitrap Velos Pro, сопряженном с нанопотоковым жидкостным хроматографом Thermo Easy-nLC-1000 (США). Идентификацию белков и количественное сравнение результатов проводили с помощью бесплатной программы MaxQuant версии 1.4. В качестве наиболее вероятных мишеней аптамеров

рассматривали белки, достоверно преобладающие в трех повторно подготовленных пробах, полученных после инкубации лизатов с аптамером, в сравнении с тремя повторными пробами контроля, проинкубированными с неспецифической последовательностью. Поиск ПТМ проводили с помощью программы Proteome Discoverer версии 1.4.

Результаты и обсуждение. В результате масс-спектрометрического анализа были получены наборы файлов, содержащие первичные и фрагментные масс-спектры уникальных пептидов для всех содержащихся в пробах белков (рис. 1).

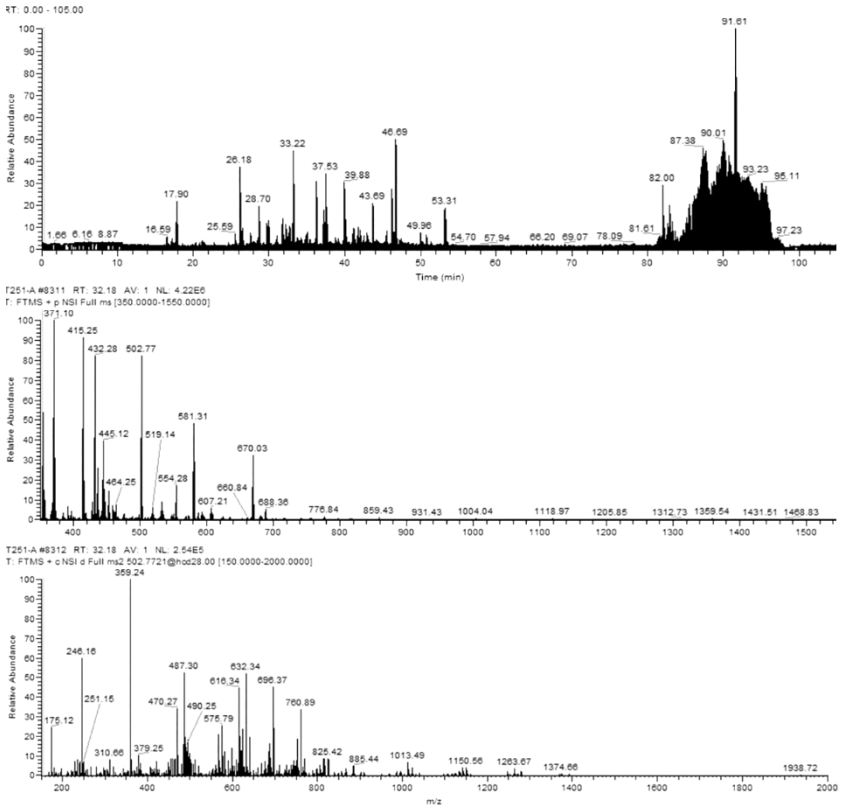


Рис. 1. Хроматограмма пептидов из белковой пробы T251-A, полученной после инкубации клеточного лизата с аптамером Gli-233 (сверху), первичный масс-спектр пептидов, полученный на 32 минуте градиента (посередине), и вторичный масс-спектр фрагментов четырехзарядного иона пептида KIHEEEVRELQEQLAR с m/z 502.77, уникального для глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (снизу).

После обработки полученных файлов, идентификации белков и сравнения их количественных показателей в рабочих и контрольных пробах были выявлены белки – вероятные мишени аптамера Gli-233, представленные в табл. 1.

Табл. 1. Наиболее вероятные белковые мишени аптамера Gli-233, выявленные методом аффинного обогащения и масс-спектрометрической идентификации.

Индекс	Название белка	Перекрытие сиквенса	Уникальных пептидов	Всего пептидов
P14136	Глиальный фибриллярный кислый белок GFAP	87.73%	42	72
P08670	Виментин	78.97%	38	65
P02768	Сывороточный альбумин	71.10%	31	58
P68871	Бета-субъединица гемоглобина	91.16%	8	16
P69905	Альфа-субъединица гемоглобина	66.90%	10	12
P68363	Альфа-1C цепь тубулина	38.80%	6	14

Путем дополнительного анализа масс-спектров для глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и альфа-1C цепи тубулина (TUBA1C) были обнаружены посттрансляционные модификации. Белок GFAP имеет признаки окисления метионина в положениях 73, 74 и 342, а также фосфорилирования серина в позициях 247 и 248. Изучение масс-спектров белка TUBA1C показало наличие нескольких вариантов присоединения боковых полимерных цепей из мономеров глицина (полиглицилирование) и глутаминовой кислоты (полиглутамилирование). Эти дополнительно разветвляющие белковую цепь полимерные модификации различной длины присоединяются к базовым мономерам глутаминовой кислоты в различных позициях в районе С-концевой части белка. Мономерное глицилирование глутаминовой кислоты обнаружено в положении 433, биглутамилирование – в положении 445, мономерное глутамилирование – в положении 447, 5-звенное полиглутамилирование – в позиции 448, триглицилирование – в позиции 433, 6-звенное полиглицилирование – в положении 443, 4-звенное полиглицилирование – в позициях 447 и 448. Известно, что полиглутамилирование тубулина временно происходит во время деления клеток и связано с нейродегенерацией [8]. Глицилирование тубулина обнаружено в аксонемах ресничек и жгутиков, которые регулируют сигнальную трансдукцию – критический медиатор опухолеобразования [9]. Эта ПТМ имеет решающее значение для прогрессирования колоректального рака [6]. Представленная изоформа альфа-1C цепи тубулина является

прогностическим маркером в глиомах, способствуя повышенной пролиферации клеток. Уровень этого белка связан с инфильтрацией иммунных клеток в микросреду опухоли и является биомаркером плохого прогноза и результатов иммунотерапии [10]. Таким образом, его можно считать потенциальной целью для терапии глиальных опухолей [11].

Заключение. Применение высокоспецифичных аптамеров, связывающихся с белковыми мишенями в раковых клетках, имеет большую роль как для поиска новых биомаркеров заболевания, так и для выявления механизмов онкогенеза, связанных с известными посттрансляционными модификациями белков. При идентификации мишеней аптамера Gli-233, подобранного к клеткам глиомы, были обнаружены посттрансляционные модификации белков GFAP и альфа-1C цепи тубулина. Полиглицилирование тубулина участвует в процессе регулирования работоспособности клеточных ресничек. Благодаря своей сенсорной роли в клетках, реснички являются центрами сигнальных путей передачи, участвующих в гомеостазе тканей, поэтому дефекты ресничек могут быть связаны с раком [12]. Таким образом в клетках глиомы были выявлены маркеры онкогенеза в виде ПТМ, ранее обнаруженных при развитии других типов рака.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка препарата на основе малой интерферирующей РНК, подавляющей экспрессию гена STAT3 для лечения глиальных опухолей мозга» (123031000006-4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma. 2018;127(2):175-186. doi:10.1007/s00412-018-0659-8
2. Pan S, Chen R. Pathological implication of protein post-translational modifications in cancer. Mol Aspects Med. 2022;86:101097. doi:10.1016/j.mam.2022.101097
3. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 1990;249(4968):505-510. doi:10.1126/science.2200121
4. Berezovski MV, Lechmann M, Musheev MU, Mak TW, Krylov SN. Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery (AptaBiD). J Am Chem Soc. 2008;130(28):9137-9143. doi:10.1021/ja801951p
5. Kichkailo AS, Narodov AA, Komarova MA, et al. Development of DNA aptamers for visualization of glial brain tumors and detection of circulating tumor cells. Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2023;32:267-288. doi:10.1016/j.omtn.2023.03.015
6. Rocha C, Papon L, Cacheux W, et al. Tubulin glycylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. EMBO J. 2014;33(19):2247-2260. doi:10.15252/embj.201488466

7. Zamay GS, Kolovskaya OS, Zamay TN, et al. Aptamers Selected to Postoperative Lung Adenocarcinoma Detect Circulating Tumor Cells in Human Blood. Molecular Therapy. 2015;23(9):1486-1496. doi:10.1038/mt.2015.108
8. Magiera MM, Janke C. Post-translational modifications of tubulin. Curr Biol. 2014;24(9):R351-354. doi:10.1016/j.cub.2014.03.032
9. Álvarez-Satta M, Matheu A. Primary cilium and glioblastoma. Ther Adv Med Oncol. 2018;10:1758835918801169. doi:10.1177/1758835918801169
10. Hu X, Zhu H, Chen B, et al. The oncogenic role of tubulin alpha-1c chain in human tumours. BMC Cancer. 2022;22(1):498. doi:10.1186/s12885-022-09595-0
11. Gui S, Chen P, Liu Y, et al. TUBA1C expression promotes proliferation by regulating the cell cycle and indicates poor prognosis in glioma. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2021;577:130-138. doi:10.1016/j.bbrc.2021.08.079
12. Michaud EJ, Yoder BK. The primary cilium in cell signaling and cancer. Cancer Res. 2006;66(13):6463-6467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0462

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ E2F1 В НЕЙРОНАХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Гузенко В.В.

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Инсульт представляет собой серьезную угрозу для жизни и здоровья людей по всему миру, являясь одной из ведущих причин смерти и инвалидности. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе гибели клеток головного мозга после ишемического инсульта, может открыть путь к предотвращению повреждения нейронов в области, прилегающей к очагу ишемии, известной как пенумбра. Несколько научных обзоров отмечают, что нейроны в самом центре инфаркта погибают путем некроза, в то время как в пенумбре этот процесс происходит через апоптоз [1]. Существует тесная корреляция между молекулярными механизмами, управляющими жизненным циклом клеток, и путями, приводящими к апоптозу нейронов [2]. В качестве ключевого регулятора в этом процессе выступает фактор транскрипции E2F1, который оказывает влияние на запрограммированную гибель нейронов. Известно, что взаимодействие E2F1 с белком ретинобластомы (pRB) переключает функции белка из активатора транскрипции в репрессор, тем самым контролируя активность E2F1 [3]. Активность E2F1 также регулируется путем ацетилирования. Ацетилирование E2F1 несколькими ацетилтрансферазами, включая PCAF, p300/CBP и Tip60 [4] стабилизируют белок, увеличивая его время жизни. Однако, исследований того, как влияет ацетилирование E2F1 на его функции в нервных клетках или животных моделях повреждений мозга, недостаточно. В связи с этим, данная работа направлена на изучение влияния E2F1 и его ацетилированных по лизину 117 (E2F1AcK117) или по лизину 125 (E2F1AcK125) форм на апоптоз нейронов в ранний период после повреждения.

Методы. Эксперименты проводились на животной модели фототромботического инсульта (ФТИ), основанные на генерации окислительного стресса. Крысы были анестезированы с помощью внутрибрюшинных инъекций Телазола (50 мг/кг) и Ксилазина (10 мг/кг). Фотосенсибилизатор бенгальский розовый (20 мг/кг) вводился через подключичную вену. Затем соматосенсорную кору облучали в течение 30 минут с помощью диодного лазера (λ = 532 нм, 60 мВт /см^2, $\varnothing$ = 3 мм). Этот

метод воздействия привел к развитию инфаркта диаметром 3 мм и перифокальной области (пенумбре) шириной 1,5 мм [5]. Крысы были анестезированы и обезглавлены через 4 часа, 24 часа или 7 дней после ФТИ. Контрольные группы включали ложнооперированных животных, которые прошли те же процедуры, но без введения фотосенсибилизатора. Для анализа экспрессии и распределения E2F1 и его ацетилированных форм в клетках ишемически поврежденной пенумбры ткани мозга крыс был использован метод иммунофлуоресцентного окрашивания. Фронтальные срезы толщиной 20 мкм были промыты в фосфатно-солевым буфером, затем инкубированы в течение часа с 5% бычьим сывороточным альбумином и 0,3% TritonX-100. После этого срезы обрабатывали в течение ночи при температуре 4°C антителами в том же растворе. Флуоресцентные микроскопические изображения получали из трех репрезентативных полей мозга животного с использованием микроскопа Nikon Eclipse FN1 с длиной волны возбуждения 488 нм и длиной волны эмиссии 555 нм. Далее был проведен вестерн-блот анализ белковых фракций ткани пенумбры. Цитоплазматические и ядерные фракции извлекали с помощью набора для экстракции CellLytic ™ NuCLEAR ™ (NXTRACT, Sigma-Aldrich). Образцы разделялись электрофоретически в полиакриламидном геле (7–10%) с додецилсульфатом натрия с использованием mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad). Каждый образец содержал 10-20 мкг белка в 15 мкл. В качестве маркера белка использовался маркер электрофореза Color Burst (Sigma-Aldrich). Затем белки электропереносились на мембрану PVDF с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе (TBS 1% Casein Blocker, Bio-Rad) в течение одного часа, затем инкубировали в течение ночи при температуре 4°C с первичными антителами. На следующий день мембраны промывали и обрабатывали вторичными антителами к пероксидазе в течение одного часа. Белки определяли с помощью субстрата Clarity Western ECL (Bio-Rad). Хемилюминесценцию анализировали с помощью системы документирования гелей Fusion SL (Vilber Лурма, Франция). Результаты измеряли путем расчета отношения оптической плотности полоски тестового белка к оптической плотности белков нормирования β-актина, GAPDH или AcH4. Для выявления парных взаимодействий субстрат-фермент был проведен анализ с использованием методов Duolink PLA (Duolink ™ In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit, Sigma-Aldrich) и коиммунопреципитации с коммерчески доступным набором, в котором используются магнитные частицы, несущие белок G (SileksMag -Protein G, Sileks). Исследования были проведены в соответствии с инструкциями

производителей к обоим наборам. Для визуализации белок-белковых взаимодействий полученный иммунопреципитат подвергали иммуноблоттингу. Также была изучена активность гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC6 на ацетилированных формах E2F1 с помощью набора для твердофазного иммуноферментного анализа. Активность HDACs количественно определяли, как значения относительной оптической плотности на нанограмм белка в образце. Влияние на клетки пенумбры у крыс оценивали с помощью анализа TUNEL (Roche, Sigma-Aldrich). Фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм обрабатывали реагентами набора в соответствии с инструкциями производителя, добавляя Hoechst 33342 в конечной концентрации 10 мкг/мл и антитела против E2F1 и его ацетилированных форм по лизину 117 или 125.

Результаты. Иммунофлуоресценция E2F1 в клетках коры головного мозга ложнооперированных животных наблюдается в основном в ядрах и лишь незначительно в цитоплазме нейронов. Вестерн-блот анализ выявил статистически значимое увеличение концентрации белка E2F1 в цитоплазматической фракции пенумбры спустя 4 часа после фототромботической ишемии, в то время как в ядерной фракции изменения не наблюдались. Это подтверждается результатами иммунофлуоресцентной микроскопии. Через сутки экспрессия E2F1 возрастает как в цитоплазматической, так и в ядерной частях клетки, достигая более высоких значений. Повышение концентрации белка E2F1 в перифокальной зоне ФТИ через 4 и 24 часа обусловлено усилением его синтеза как в нервных клетках, так и в активированных астроцитах, тогда как в микроглии этот показатель не меняется. По данным вестерн-блота и иммунофлуоресценции к 7 дню после ФТИ содержание E2F1 снижается до уровня, характерного для контрольной группы. Однако, в клетках микроглии экспрессия E2F1 наблюдается только на 7 сутки (рис. 1).

В открытой базе данных UniProt (http://www.uniprot.org/) и программе GPS-PAIL 2.0 (http://pail.biocuckoo.org/online.php) был проведен поиск известных ацетилтрансфераз, способных ацетилировать E2F1. Благодаря поиску стало известно, что ацетилирование E2F1 может потенциально осуществляться PCAF и p300 по лизинам K117 и K125. Оценив изменения уровней ацетилирования E2F1 по лизинам 117 (E2F1AcK117) и 125 (E2F1AcK125) с помощью иммунофлуоресценции и вестерн-блот анализа было выявлено, что как E2F1AcK117, так и E2F1AcK125 достоверно не изменялись после ФТИ относительно ложнооперированных образцах. Оба метода подтверждают недостоверность результатов. Обе ацетилированные формы E2F1 преимущественно локализуются в ядрах нейронов.

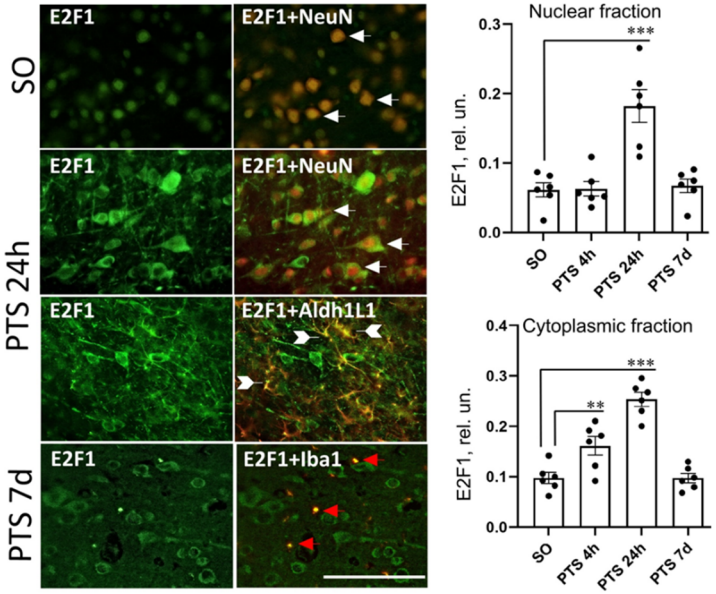


Рис. 1. Влияние ФТИ на уровень и локализацию E2F1. Иммунофлуоресценция E2F1 в ложнооперированном (SO) контроле и в разное время (24 ч, 7 дней) после ФТИ, в сочетании с маркерами нейронов (NeuN), астроцитов (Aldh1L1), микроглии (Iba1) и ядер (Hoechst 33342). Стрелки указывают на соответствующие типы клеток и компартменты. Масштабная линейка 100 мкм. Диаграммы визуализируют динамику уровней E2F1 в цитоплазматической и ядерной фракциях согласно анализу вестерн-блоттинга. ** и ***p-значения (<0,01 и <0,005 соответственно).

Коиммунопреципитация и анализ Duolink PLA показывают, что через 24 ч после ФТИ ацетилирование как ядерного, так и цитоплазматического E2F1 осуществляется в основном PCAF и в меньшей степени ацетилтрансферазой p300. Активность гистондеацетилаз (HDACs) показала, что HDAC1 деацетилирует преимущественно E2F1AcK125, поскольку активность HDAC1 увеличивалась более, чем в 2 раза в иммунопреципитате E2F1AcK125 ядерной фракции ткани перифокальной области через 24 часа после ФТИ. Вероятно, деацетилирование E2F1AcK117 осуществляют деацетилазы другого типа (рис. 2).

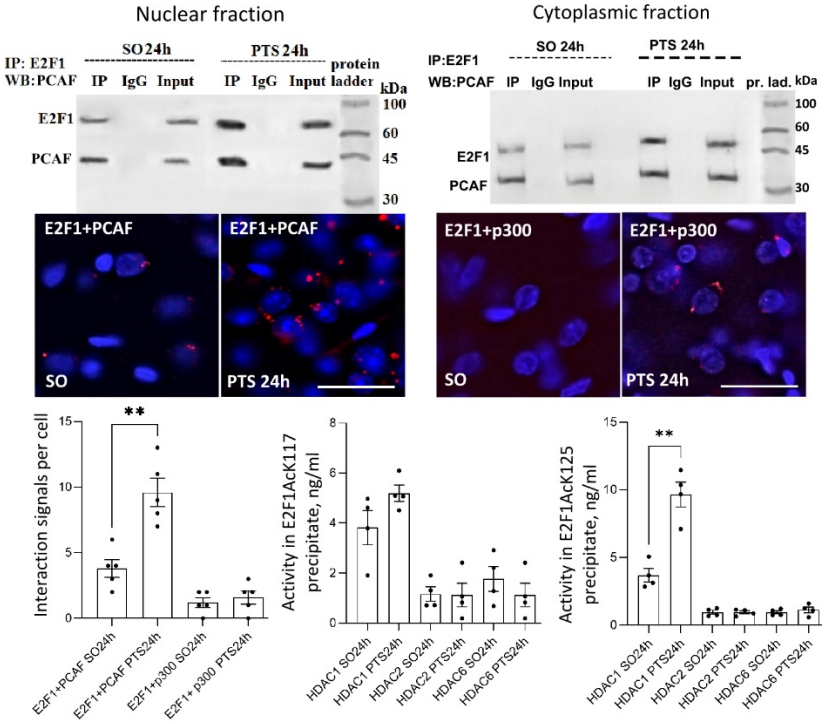


Рис. 2. Коиммунопреципитация E2F1 с ацетилтрансферазами и сигналы Duolink PLA, указывающие на взаимодействие E2F1 с PCAF. Синий – ядра (окрашенные DAPI), красный – сигналы Duolink. Масштабная линейка: 50 мкм. Количественный график данных Duolink PLA. Активность HDACs 1, 2 и 6 в преципитатах ацетилированных форм E2F1. Столбчатые диаграммы: среднее значение; * $p < 0,05$,* * $p < 0,01$.

Изучив влияние точечного ацетилирования E2F1 по лизину 117 или 125 на апоптоз клеток перифокальной области после ФТИ не удалось обнаружить статистически значимые различия в количестве TUNEL-позитивных клеток, экспрессирующих E2F1AcK117 или E2F1AcK125. Однако двойное окрашивание клеток на активную каспазу-3 и E2F1AcK117 или E2F1AcK125, показало увеличение нейронов иммунопозитивных по E2F1AcK117 и активной каспазе-3 (рис. 3).

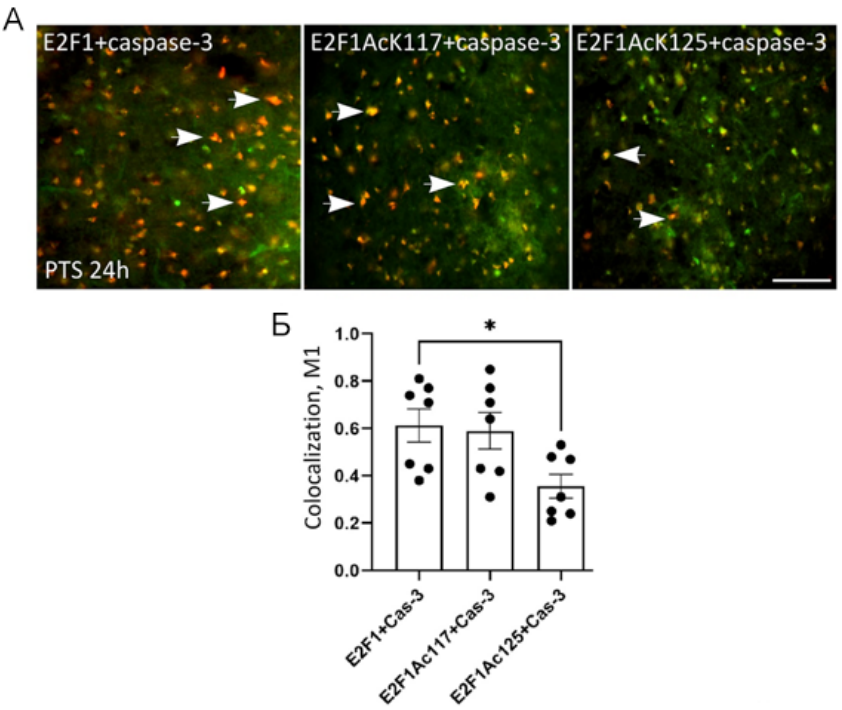


Рис. 3. Колокализация E2F1 и его ацетилированных форм AcK117 и AcK125 с активной каспазой-3 через 24 ч после ФТИ. А. Иммунофлуоресцентные фотографии тканей пенумбры, стрелки указывают на наблюдаемую колокализацию. Масштабная линейка 50 мкм. Б. График колокализации Мандера M1. Столбчатая диаграмма представлена как среднее значение ± SEM. *, обозначают $p<0,05$.

Заключение. Получив данные результаты можно предположить, что белок E2F1, вероятно, ацетилирован по лизину 125 ацетилтрансферазой PCAF. Ацетилирование E2F1 по лизину 117 способствует усилению апоптоза нейронов после повреждения. Уровень ацетилирования E2F1AcK125 поддерживаются HDAC1. Идентификация деацетилазы, которая специфически деацетилирует E2F1 по лизину 117, позволит модулировать апоптоз нейронов, вызванный окислительным повреждением. Изменяя уровень и действие ацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов, влияющих на E2F1 может стать перспективной мишенью в лечении инсульта и других нейродегенеративных расстройств.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ № FENW-2023-0018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Becker E. B. E., Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease //Progress in neurobiology. – 2004. – Т. 72. – №. 1. – С. 1-25.
2. Culmsee C., Mattson M. P. p53 in neuronal apoptosis //Biochemical and biophysical research communications. – 2005. – Т. 331. – №. 3. – С. 761-777.
3. Sidle A. et al. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation //Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 1996. – Т. 31. – №. 3. – С. 237-271.
4. Martínez-Balbás M. A. et al. Regulation of E2F1 activity by acetylation //The EMBO journal. – 2000.
5. Ianari A. et al. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Т. 279. – №. 29. – С. 30830-30835.
6. Demyanenko S., Uzdensky A. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex //Molecular neurobiology. – 2017. – Т. 54. – С. 6839-6856.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ С НЕУПОРЯДОЧЕННОЙ СТРУКТУРОЙ В РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОК МОЗГА

Демьяненко С.В.

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

Введение. Парадигма структуры и функции белка была создана в 20 веке. Ключевым моментом этой парадигмы было то, что упорядоченная трехмерная структура белка, зашифрованная в его аминокислотной последовательности, является обязательным условием для его функционирования. За прошедшие годы наше понимание структуры и функций белков значительно расширилось. Более 30% белков не имеют стабильной трехмерной структуры в значительных областях или по всей длине (внутренне неупорядоченные белки, intrinsically disordered proteins (IDPs), около 70% белков обладают внутренне неупорядоченными областями (intrinsically disordered regions, IDR). Другие белки полностью структурированы, принимают уникальную конформацию и не имеют IDR. Конформационная гибкость IDPs позволяет обнажать короткие пептидные мотивы, которые могут динамически взаимодействовать с рядом партнеров по связыванию. Связываясь с другими белками и пептидами IDPs складываются определенным образом, что обеспечивает высокоспецифичные взаимодействия, хотя и с относительно низким сродством и быстрой диссоциацией, что имеет решающее значение в выполнении ими регуляторных и сигнальных функций, где гибкость и быстрая перестройка имеют важное значение [1]. Все больше данных подтверждают важную роль таких концентраторов белков в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, рака и нейродегенерации [3].

Участие белков с неупорядоченной структурой в выживании и гибели нейронов. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что изменение конформации IDPs под влиянием различных факторов таких как температура, pH, концентрация ионов, а также благодаря различным посттрансляционным модификациям (ПТМ), позволяет таким белкам функционировать как переключатели и реостаты [2]. ПТМ многофункциональных IDPs, таких как p53, MYC, FOXO, E2F1 и ряда других, являющихся концентраторами нескольких сигнальных путей в клетке, могут оказывать существенное влияние на конформацию белка, его локализацию и взаимодействие с партнерами, что, в итоге, может приводить к реализации ими диаметрально противоположных функций. Факторы транскрипции p53, MYC, FOXO, E2F1, участвующие в регуляции

апоптоза, энергетического баланса, пролиферации и клеточного цикла, в зависимости от контекста могут способствовать, как гибели нейронов после повреждения, так и их выживанию и регенерации [3].

Последние исследования свидетельствуют о том, что плохо регулируемая попытка нейронов вернуться в клеточный цикл приводит к их дегенерации. Но, в то же время, ряд данных указывают на неожиданно высокий антиапоптотический и регенеративный потенциал таких белков, как p53 и c-Myc [3,4]. Что открывает новые возможности для нейропротекции.

С другой стороны, нейродегенеративные заболевания, такие как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона, имеют общую патологическую черту: накопление неправильно свернутых белков, особенно с участием IDPs, таких как TDP-43, FUS, Tau, α-синуклеин и Хантингтин. Эти белки подвергаются патологической агрегации, образуя токсичные включения, которые нарушают функционирование нейронов и вызывают их гибель [5]. Из-за природы IDPs α-синуклеин, Tau, β-амилоид и др. в зависимости от ПТМ и точечных мутаций способны образовывать олигомеры и фибриллы нейротоксического действия [5].

Системы поддержания протеостаза. Поскольку агрегация белка связана с его неправильным сворачиванием, то первой линией защиты выступают шапероны. Недавние исследования показывают участие шаперонов HspB8 и Hsp70 в снижении аберрантных фазовых переходов белков FUS и TDP-43, соответственно, что приводит к их стабилизации [5]. Шаперон Hsp104 способен дезагрегировать TDP-43, FUS и альфа-синуклеин [5]. Убиквитин-зависимая или убиквитин-независимая протеасомная системы, как и лизосомальная система являются второй линией защиты клеток от накопления неправильно свернувшихся или склонных к агрегации белков.

Трудности при разработке препаратов для регуляции активности и агрегации IDP. Все чаще IDP считают потенциальными мишенями для терапии многофакторных заболеваний, включая инсульт и нейродегенерацию. Однако ряд проблем усложняет их разработку. Присущая IDPs неупорядоченность затрудняет использование подходов рационального дизайна препаратов на основе малых молекул. Отсутствие стабильных третичных структур IDP даже в связанных состояниях усложняет стратегии дизайна на основе структуры. В результате многие патологии с участием IDP считаются не поддающимися лечению традиционными методами. В этой связи нацеливание на ферменты, осуществляющие ПТМ или системы поддержания протеостаза являются перспективным (рис. 1). Однако, число экспериментально наблюдаемых сайтов в белке для различных ПТМ значительно превосходит количество

человеческих генов, кодирующих белки. Кроме того, ПТМ, обнаруженные с помощью масс-спектрометрических методов, намного превосходят количество функционально понятных ПТМ. В случае фосфорилирования, например, функциональная информация существует менее чем для 3% картированных фосфозитов человеческих белков, для сайтов ацетилирование этот показатель значительно ниже. При этом отдельные ПТМ данного белка все чаще рассматриваются как часть регуляторных сетей ПТМ, действующих в комбинации для достижения функциональных результатов [6]. Данные показывают, что там, где существуют обратные корреляции между различными ПТМ, эти ПТМ могут функционировать как исключающие переключатели «ИЛИ-ИЛИ» для альтернативных клеточных эффектов. Этот принцип применим к фосфорилированию против ацетилирования, к фосфорилированию против метилирования и метилированию против ацетилирования. Поэтому необходимы дополнительные исследования для регуляции IDPs путем нацеливания на ферменты, участвующие в их ПТМ.

С другой стороны, усиление систем деградации агрегированных белков: шапероны, аутофагия, активация протеасомной деградации, например, с помощью молекул PROTAC (proteolysis targeting chimera), являются многообещающими, но остаются сложными для реализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-15-00268.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruff KM, Pappu RV. AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. J Mol Biol. 2021;433(20):167208.
2. Trivedi R, Nagarajaram HA. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. Int J Mol Sci. 2022;23(22):14050.
3. Khaitin AM, Guzenko VV, Bachurin SS, Demyanenko SV. c-Myc and FOXO3a-The Everlasting Decision Between Neural Regeneration and Degeneration. Int J Mol Sci. 2024;25(23):12621.
4. Guzenko VV, Bachurin SS, Khaitin AM et al. Acetylation of p53 in the Cerebral Cortex after Photothrombotic Stroke. Transl Stroke Res. 2024;15(5):970-985.
5. Utami KH, Morimoto S, Mitsukura Y, Okano H. The roles of intrinsically disordered proteins in neurodegeneration. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2025;1869(4):130772.
6. Lee JM, Hammarén HM, Savitski MM, Baek SH. Control of protein stability by post-translational modifications. Nat Commun. 2023;14(1):201.

РОЛЬ FOXO1 И FOXO3A В ГИБЕЛИ И ВЫЖИВАНИИ НЕЙРОНОВ ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Калюжная Ю.Н.

Лаборатория «Молекулярная нейробиология» Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Баланс между регенерацией и дегенерацией нейронов является критическим фактором здоровья и функционирования нейронов, а также имеет важное значение для восстановления после нейродегенеративных заболеваний и травм. Важную роль в процессах регенерации и дегенерации нейронов играют белки семейства FOXO [1]. Данное исследование направлено на выяснение механизмов влияния FOXO1 и FOXO3a на гибель нейронов при различных типах повреждений, а также на оценку нейропротекторного потенциала ингибирования FOXO1, что может открыть новые перспективы для терапии нейродегенеративных заболеваний и последствий травм нервной системы.

Цель работы: Изучение роли транскрипционных факторов FOXO1 и FOXO3a в механизмах гибели нейронов при нейродегенеративном повреждении, вызванном окислительным стрессом, бета-амилоидом и механической травмой, а также оценка потенциального нейропротекторного эффекта ингибирования FOXO1.

Материалы и методы. Методом электронной иммуногистохимии было проведено исследование субклеточной локализации FOXO1 (HPA001252, Anti-FOXO1 antibody produced in rabbit poly, Sigma-Aldrich) и FOXO3a (SAB1411797, ANTI-FOXO3A antibody produced in mouse mono, Sigma-Aldrich) в нейронах поврежденных раздавливанием седалищного нерва ганглиев крыс (dorsal root ganglion, DRG). Крыс анестезировали путем внутримышечной инъекции 1,7 мл смеси 2:1 Ксилы и Телазола. Сегмент седалищного нерва длиной 3 мм раздавливали путем максимального сдавливания нерва незубчатыми кровоостанавливающими щипцами (модель 65-Н) в течение 20 сек. Электронная иммуногистохимия проводилась на срезах DRG по протоколу pre-embedding, как подробно описано в ранее [2]. Выявление иммунных комплексов проводилось с использованием набора реагентов «Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision (антитела к IgG мыши/кролика – HRP/DAB) для проведения иммуногистохимических исследований (ПраймБиоМед, Россия).

Оценка влияния окислительного стресса и бета-амилоида на уровень и локализацию FOXO1 и FOXO3a, а также некоторых фосфорилированных форм FOXOs проведена на дифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y. Дифференцировку клеток SH-SY5Y и моделирование окислительного стресса проводили описанным ранее

способом [3]. Через пять дней после дифференциации добавляли Фотодитазин (ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО», Россия) с конечной концентрацией 0,75 мкМ за 0,5 ч до облучения лазером в темноте. Затем клетки облучали лазером в течение 30 мин и инкубировали в темноте в течение 2 ч.

В качестве клеточной модели нейродегенерации использовали модель бета-амилоидной токсичности. Использовали амилоидные олигомеры из синтетического пептида Aβ 1-42 (A9810; Sigma-Aldrich). Конечная концентрация Aβ в лунке составляла 0,1 мкМ.

Была проведена оценка влияния ингибитора FOXO1 AS1842856 (344355, Sigma-Aldrich) на апоптоз и некроз культивированных нейронов при фотодинамическом повреждении и через 8 часов после добавления в среду культивирования олигомерного Aβ. Ингибитор FOXO1 AS1842856 (100 нМ) применяли сразу после Фотодитазина. Для оценки влияния ингибитора на апоптоз клеток использовали анализ TUNEL, который маркирует разрывы нитей ДНК с помощью набора In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (#12156792910, Roche) в соответствии с рекомендациями производителя. Количественное содержание некротических клеток рассчитывали по формуле: % гибели клеток = (количество клеток, окрашенных йодистым пропидием / общее количество клеток, окрашенных Hoechst 33342) × 100. Подсчет погибших/умирающих клеток и общего количества клеток проводили в шести полях зрения, каждое из которых включало не менее 50 клеток. Индекс апоптоза (ИИ) рассчитывали для TUNEL-положительных клеток при увеличении 20х по формуле: АИ = Количество TUNEL-положительных клеток/Общее количество клеток (окрашенных Hoechst 33342) × 100 [3].

Результаты и обсуждение. В норме уровень FOXO1 как в ядрах, так и в цитоплазме нейронов DRG невысок (Рис. 1А,Б). Однако через 3 суток после повреждения аксонов, уровень FOXO1 значительно увеличивается в цитоплазме, но не в ядрах нейронов (Рис. 1В,Г).

FOXO3a в нейронах DRG присутствует в значительных количествах и обладает выраженной цитоплазматической локализацией (Рис. 1Д,Е). Повреждение аксонов через 3 суток вызывало увеличение уровня FOXO3a в цитоплазме нейронов DRG, но не в их ядрах (Рис. 1Ж,З).

Обращает на себя внимание более низкий уровень экспрессии FOXO1 по сравнению с FOXO3a нейронах DRG. Причем FOXO1 преимущественно располагается вблизи цитоплазматической мембраны нейронов (Рис. 1В,Г).

Цитоплазматическая аккумуляция FOXO1 и FOXO3a после аксотомии указывает на их вовлеченность в посттравматические процессы нейронов DRG, но без немедленной ядерной транслокации. Это может отражать адаптивный механизм, направленный на регенерацию или защиту от апоптоза.

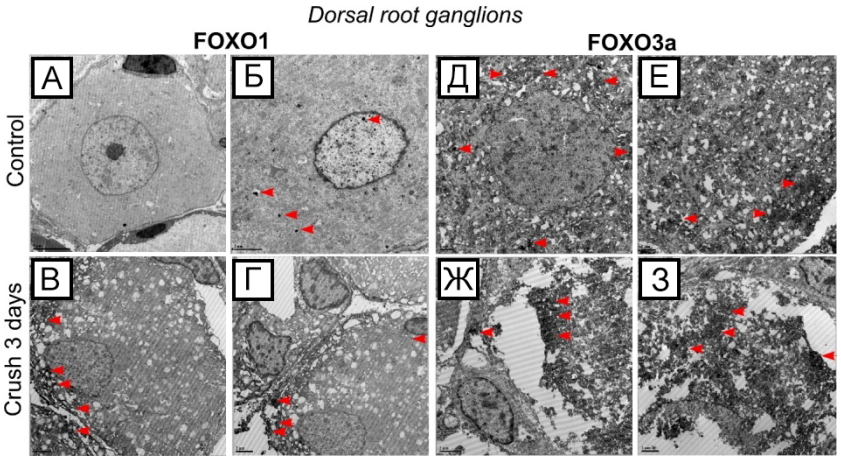


Рис. 1. А, Б. Ультраструктура нейронов в DRG контрольной крысы. Незначительное количество продуктов иммуногистохимической реакции с FOXO1 (HPA001252, Sigma-Aldrich) в цитоплазме и ядрах нейронов (красные стрелки). Увеличение 10 000 и 20 000, соответственно. В, Г. Ультраструктура нейрона в DRG крысы на третьи сутки после сдавливания седалищного нерва. Цитоплазматическая локализация продуктов иммуногистохимической реакции с FOXO1 вблизи цитоплазматической мембраны (красные стрелки). Увеличение 12 000. Д, Е. Ультраструктура нейронов в DRG контрольной крысы. Значительное количество продуктов иммуногистохимической реакции с FOXO3a (SAB1411797, Sigma-Aldrich) в цитоплазме, но не в ядрах нейронов (красные стрелки). Увеличение 10 000 Ж, З. Ультраструктура нейрона в DRG крысы на третьи сутки после сдавливания седалищного нерва. Увеличение уровня продуктов реакции с FOXO3a в цитоплазме, но не в ядрах нейронов (красные стрелки). Увеличение 10 000.

FOXO1 присутствует как в цитоплазме, так и в ядрах культивируемых нейронов (Рис. 2А,Б). FOXO3a также имеет ядерно-цитоплазматическую локализацию (Рис. 2Г,Д).

Окислительный стресс через 2 часа вызывал увеличение уровня как FOXO1, так и FOXO3a в ядрах выживших нейронов (Рис. 2В). Олигомерный Aβ увеличивал уровень FOXO1 и FOXO3a уже через 4 и 8 часов, соответственно, после добавления в среду культивирования (Рис. 2Е,Ж), также усиливая ядерную локализацию белков (Рис. 2Е,Ж).

Ядерная транслокация FOXO1/FOXO3a под действием стрессоров (Aβ, окислительный стресс) свидетельствует об их активации и возможном участии в регуляции апоптоза, выживаемости нейронов или нейродегенеративных процессов.

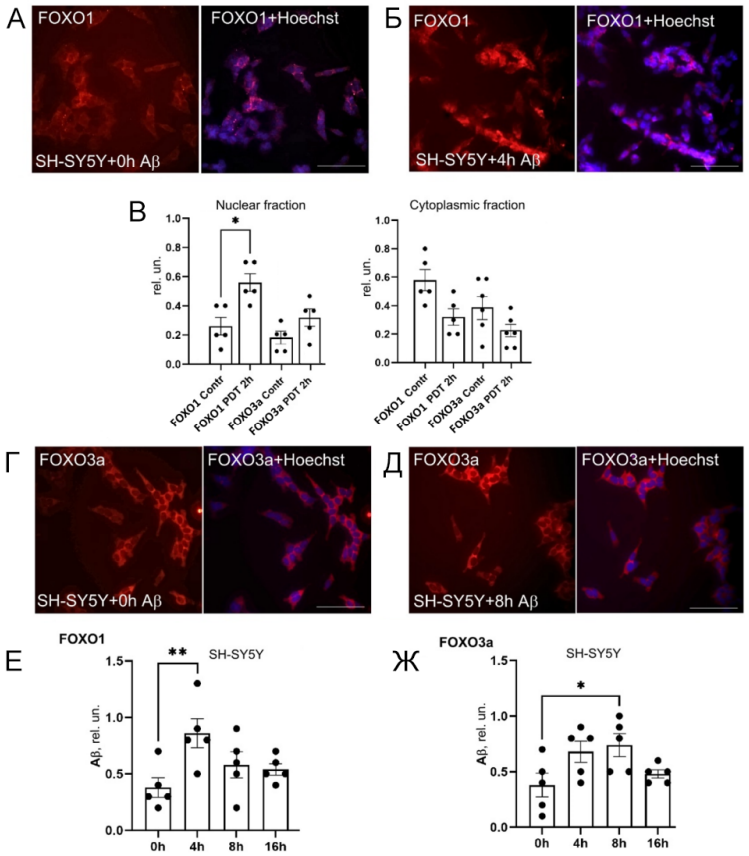


Рис. 2. А, Б. Иммунофлуоресценция FOXO1 (красный) в дифференцированных клетках SH-SY5Y до (А) и через 4 часа (Б) после добавления в среду культивирования олигомерного бета-амилоида (Аβ). Совмещенные изображения FOXO1 с Hoechst33342 (маркер ядер, синий). Масштаб: 50 мкм. В. Вестерн-блот анализ уровня FOXO1 и FOXO3a в относительных единицах (rel. un.) в ядерной и цитоплазматической фракциях дифференцированных клеток SH-SY5Y в норме и через 2 часа после окислительного стресса, вызванного фотодинамическим воздействием (PDT 2h). Г, Д. Иммунофлуоресценция FOXO3a (красный) в дифференцированных клетках SH-SY5Y до (Г) и через 8 часов (Д) после добавления в среду культивирования Аβ. Совмещенные изображения FOXO3a с Hoechst33342 (маркер ядер, синий). Масштаб: 50 мкм. Е, Ж. Вестерн-блот анализ уровня FOXO1 (Е) и FOXO3a (Ж) в относительных единицах (rel. un.) в лизате дифференцированных клеток SH-SY5Y в норме и через 4, 8 и 16 часов после добавления в среду культивирования олигомерного Аβ. t-test (В) или One-way ANOVA с Dunnett's test (Е, Ж). M±SEM, *p≤0,05, **p≤0,01 относительно контрольных значений. N=5-6.

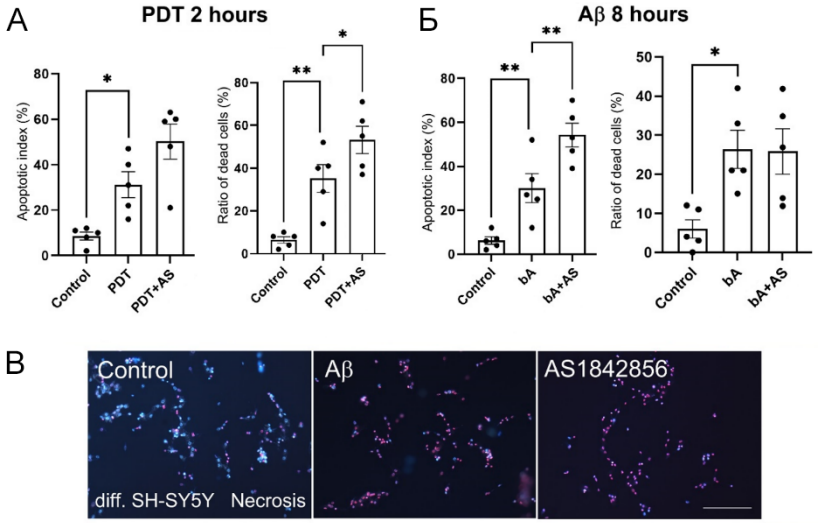


Рис. 3. А. Изменение апоптотического индекса (%) и количества некротических клеток (%) в дифференцированных клетках SH-SY5Y через 2 часа после PDT и при введении в среду культивирования ингибитора FOXO1 AS1842856. Б. Изменение апоптотического индекса (%) и количества некротических клеток (%) в дифференцированных клетках SH-SY5Y через 8 часов после добавления в среду культивирования олигомерного бета-амилоида (Aβ) и при введении ингибитора FOXO1 AS1842856. В. Уровень некроза дифференцированных клеток SH-SY5Y через 8 часов после добавления в среду культивирования олигомерного бета-амилоида (Aβ) и при введении в среду культивирования ингибитора FOXO1 AS1842856. Окрашивание йодистым пропидием (ядра мертвых клеток, красный) и Hoechst33342 (ядра клеток, синий). Масштаб: 200 мкм. А, Б One-way ANOVA с Dunnett's test. M±SEM, *p≤0,05, **p≤0,01 относительно контрольных значений. N=5-6.

Ингибирование активности нефосфорилированного по серину 256 FOXO1 AS1842856 несколько увеличивало процент апоптозных и некротических клеток после действия окислительного стресса (Рис. 3А) и процент апоптозных (Рис. 3Б,В), но не некротических клеток, после введения в среду культивирования Aβ (Рис. 3Б,В).Ингибирование FOXO1 усугубляет гибель нейронов, что подчеркивает его защитную функцию при стрессе. Однако его роль при Aβ-повреждении требует дальнейшего изучения.

Таким образом, FOXO1 и FOXO3a выступают важными регуляторами нейронального ответа на повреждение, выполняя как защитные, так и потенциально патогенные функции в зависимости от типа

и длительности стрессового воздействия. Их двойственная подчеркивает необходимость дальнейших исследований для уточнения молекулярных механизмов и разработки таргетных терапевтических стратегий при нейродегенеративных заболеваниях и травмах нервной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда РНФ, грант № 24-15-00268 (хирургические вмешательства, исследования на клеточных культурах и иммуногистохимические исследования).

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu XL, Gao CC, Qi M, Han YL, Zhou ML, Zheng LR. Expression of FOXO transcription factors in the brain following traumatic brain injury. *Neuroscience Letters*. 2021;753:135882.
2. Sharifulina S, Khaitin A, Guzenko V, et al. Expression of Amyloid Precursor Protein, Caveolin-1, Alpha-, Beta-, and Gamma-Secretases in Penumbra Cells after Photothrombotic Stroke and Evaluation of Neuroprotective Effect of Secretase and Caveolin-1 Inhibitors. *Biomedicines*. 2022;10(10):2655.
3. Guzenko VV, Bachurin SS, Dzreyan VA, Khaitin AM, Kalyuzhnaya YN, Demyanenko SV. Acetylation of C-MyC at lysine 148 protects neurons after ischemia. *NeuroMolecular Medicine*. 2024;26(1).

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ C-MYC ПО ЛИЗИНАМ 148 И 323 В НЕЙРОНАХ ПОСЛЕ ФТИ

Куницына А.Е.

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Семейство MYC включает транскрипционные факторы c-Myc (экспрессируется повсеместно), N-Myc (нейрональная форма) и L-Myc (легочная форма), которые содержат домен bHLH-Zip и функционируют не только на транскрипционном уровне, но также являются эпигенетическими регуляторами [1]. c-Myc участвует в регуляции 10–15% всех генов в нетрансформированных опухолевых клетках, контролируя энергетический метаболизм, синтез белков и клеточный цикл. В последние годы появляется всё больше данных о повышении активности c-Myc при острых и хронических повреждениях центральной и периферической нервной системы. С одной стороны, повышение уровня c-Myc в нейронах после ишемии усиливает апоптоз [2], а с другой – защищает нейроны [3] и стимулирует нейрогенез [4].

Важно, что активность c-Myc во многом зависит от его локализации и взаимодействия с белками-партнёрами, что, в свою очередь, регулируется посттрансляционными модификациями. К сожалению, почти ничего не известно о роли этой модификации в нервных клетках.

Цель данной работы — оценить уровень c-Myc в перифокальных клетках после фототромботического инсульта (ФТИ) и изучить способы регуляции свойств белка через его ацетилирование.

Материалы и методы. В качестве модельных животных нами были использованы взрослые мыши CD-1 и крысы линии Wistar. Ишемическое повреждение коры головного мозга вызывали методом фототромбоза (ФТИ). Для индукции окислительного стресса дифференцированные клетки нейробластомы SH-SY5Y подвергали облучению лазером в присутствии фотосенсибилизатора. Срезы головного мозга и клеточные культуры окрашивали флуоресцентными красителями или обрабатывали методом иммуногистохимии с последующей визуализацией на флуоресцентном микроскопе. Уровни исследуемых белков анализировали методами вестерн-блоттинга, Duolink PLA и ко-иммунопреципитации. Структурные особенности белков изучали с помощью молекулярно-динамической симуляции.

Для сравнения групп с одной независимой переменной применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для исследований с двумя независимыми переменными применялся двухфакторный дисперсионный анализ. В экспериментах с ингибиторами белков

статистическую значимость оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде среднее значение ± SEM.

Результаты. При иммунофлуоресцентном анализе коры головного мозга интактных животных обнаружена слабая экспрессия c-Myc. Антитела к N-концу c-Myc выявляли белок как в цитоплазме, так и (в меньшей степени) в ядре, тогда как антитела к C-концу преимущественно детектировали ядерную локализацию c-Myc.

Известно, что низкие уровни c-Myc характерны для постмитотических нейронов *in vivo*, а ранняя индукция c-Myc может инициировать апоптоз и гибель нейронов. Добавление ингибитора c-Myc 10058-F4 в культуральную среду дифференцированных клеток SH-SY5Y снижало процент гибели клеток после индуцированного фотодинамической терапией окислительного стресса почти в два раза.

Мы исследовали изменения уровня ацетилирования c-Myc по лизиновым остаткам в позициях 148 (N-концевой домен TAD) и 323 (последовательность ядерной локализации, NLS). Через 4 часа после PTS наблюдалось увеличение уровня c-MycAcK148 в цитоплазме периинфарктных нейронов, а через 24 часа количество белка превышало контрольные значения более чем в 2 раза. В отличие от c-MycAcK148, c-MycAcK323 демонстрировал преимущественно ядерную локализацию в нейронах.

Ацетилтрансфераза p300/CBP способна ацетилировать c-Myc по остаткам K148 и K323, что ускоряет деградацию белка. В то же время ацетилирование c-Myc по K323 под действием PCAF или TIP60, напротив, стабилизирует белок, предотвращая его убиквитинирование и протеасомную деградацию. Методами Duolink PLA и иммунопреципитации мы установили, что ацетилирование c-Myc происходит как в ядре, так и в цитоплазме, о чем свидетельствует обнаружение сигналов взаимодействия c-Myc с p300 и PCAF в обоих клеточных компартментах. При этом через 24 часа после ишемии c-Myc преимущественно ко-преципитировал с p300 и в меньшей степени с PCAF.

Анализ взаимодействия ацетилированных форм c-Myc (c-MycAcK148 и c-MycAcK323) с деацетилазами HDAC1, HDAC2, HDAC6, SIRT1 и SIRT2 показал, что SIRT2, по-видимому, участвует в деацетилировании преимущественно c-MycAcK148 в цитоплазме; а HDAC2 деацетилирует c-MycAcK323 в ядрах нервных клеток. При этом не было выявлено значимого взаимодействия c-MycAcK148 или c-MycAcK323 с HDAC1, HDAC6 и SIRT1.

Для понимания влияния ацетилирования c-Myc по лизинам 148 или 323 на конформацию белка была проведена молекулярно-динамическая симуляция. Анализ графиков среднеквадратичных отклонений (RMSD) не выявил существенных различий между референсной структурой и

c-MycAcK148. Однако высокие значения коэффициентов RMSD указывают на значительные конформационные изменения в обеих структурах. В отличие от этого, ацетилирование по позиции 323 ограничивает конформационную подвижность c-Myc, что проявляется низкими значениями RMSD и быстрым выходом на плато.

Оказалось, что немодифицированный c-Myc компактизуется быстрее и сильнее, чем c-MycAcK148. Результаты анализа структур белков четко демонстрируют, что ацетилирование лизина 148 вызывает значительную конформационную перестройку c-Myc: из-за невозможности образования водородной связи с глутамином (122) происходит переориентация α-цепей. По-видимому, положительно заряженная аминогруппа лизина 148 служит точкой сборки третичной структуры c-Myc, стабилизируя её.

По всей видимости, такая реорганизация не является случайной, и различные конформации c-Myc, возникающие в результате точечного ацетилирования, приводят к формированию различных доменов связывания с регуляторными или функциональными белками. Мы проверили эту гипотезу на моделях докинга ацетилированных и неацетилированных форм c-Myc с его основными партнёрами – белками Max и α-тубулином.

Полученные геометрические параметры после завершения расчетов молекулярной динамики свидетельствуют о выраженном дестабилизирующем влиянии ацетилирования на четвертичную структуру комплекса c-Myc/Max. Средние значения RMSD для неацетилированного комплекса оказались в два раза ниже, что указывает на его большую стабильность.

В цитоплазме c-Myc может присутствовать в форме N-концевого фрагмента c-Myc-nick, одним из ключевых партнеров которого является α-тубулин. Наши расчеты показали, что ацетилирование фрагмента c-Myc-nick (1-298) по лизину 148 не вызывает существенных различий в характере взаимодействия с α-тубулином, хотя высокие значения коэффициентов RMSD указывают на значительные конформационные изменения в обеих структурах.

Результаты анализа методом Duolink PLA не выявили значимых различий в количестве сигналов взаимодействия между ацетилированной (по K148) и неацетилированной формами c-Myc с α-тубулином в периинфарктных клетках через 24 часа после PTS.

Полученные данные позволяют предположить, что увеличение ацетилирования c-Myc по лизину 148 в цитоплазме нейронов ишемической полутени может препятствовать транслокации вновь синтезированного белка в ядро за счет снижения его компактизации, что способствует действию кальпаинов и образованию c-Myc-nick, уменьшая

таким образом пул ядерного c-Myc; а также регулировать взаимодействие цитоплазматического c-Myc с другими (пока не идентифицированными) белковыми партнерами, отличными от тубулинов.

Заключение. В данном исследовании мы показали, что ФТИ приводит к увеличению ацетилирования c-Myc по лизину 148, но не по лизину 323.

Результат МДС показал, что ацетилирование лизина в позиции 148 вызывает значительную конформационную перестройку c-Myc. По-видимому, положительно заряженная аминогруппа лизина служит точкой сборки третичной структуры c-Myc, стабилизируя ее, тогда как ацетилирование оказывает противоположный эффект и препятствует образованию комплекса с Max. Этот эффект может быть особенно важен для блокирования функций c-Myc в раковых клетках.

Как было показано, цитоплазматическая форма c-Myc, Myc-nick, может образовываться в результате кальпаин-зависимого протеолиза полноразмерного c-Myc по лизину 298. Myc-nick связывается с α-тубулином и индуцирует ацетилирование α-тубулина гистонацетилтрансферазами. В нейронах ацетилированный α-тубулин участвует как в морфогенезе дендритов, так и в росте аксонов. Как показал анализ МДС, ацетилирование фрагмента c-Myc-nick по лизину 148 не оказывает существенного влияния на его связывание с α-тубулином и, вероятно, на последующее ацетилирование α-тубулина ацетилтрансферазами.

Как показано в наших исследованиях, за ацетилирование c-Myc в нейронах после ишемии в первую очередь ответственна ацетилтрансфераза p300 и в меньшей степени PCAF, тогда как c-MycAcK323 деацетилируется HDAC2, а c-MycAcK148 – SIRT2. Можно предположить, что увеличение уровня ацетилирования c-Myc по лизину 148 после ФТИ под действием ацетилтрансферазы p300 может предотвращать связывание белка с его партнером Max, препятствуя реализации его проапоптотического потенциала.

Стратегии, направленные на увеличение ацетилирования c-Myc по лизину 148 за счет повышения активности ацетилтрансферазы p300 или снижения активности SIRT2, могут усилить регенеративный потенциал нейронов после ишемии. В нашей работе мы оценили модификацию и роль ацетилирования только двух лизинов. Однако стоит учитывать, что регуляция многофункциональных, внутренне неупорядоченных белков, таких как c-Myc, включает множественные посттрансляционные модификации.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 24-15-00268.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uzdensky A.B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro-and antiapoptotic proteins // Apoptosis. – 2019. – Т. 24. – №. 9. – С. 687-702.
2.Demyanenko S., Uzdensky A. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex // Molecular neurobiology. – 2017. – Т. 54. – С. 6839-6856.
3. Liu X. et al. c-myc protects mice from ischemia stroke through elevating microRNA-200b-5p-regulated SIRT1 expression // Brain Research Bulletin. – 2021. – Т. 176. – С. 76-84.
4. Wi S. et al. In vivo expression of reprogramming factors increases hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity in chronic hypoxic-ischemic brain injury // Neural plasticity. – 2016. – Т. 2016. – №. 1. – С. 2580837.

Сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ У ЭРИТРОЦИТОВ ПТИЦ

Волкова А.А., Миндукшев И.В.

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

Введение. Эритроциты являются наиболее многочисленной популяцией клеток крови, выполняющей ключевую функцию транспорта газов благодаря гемоглобину. В наших предыдущих исследованиях было показано, что реакция эритроцитов человека на окислительный стресс имеет свои особенности, обусловленные отсутствием у них ядра и митохондрий [1]. Однако у птиц эритроциты сохраняют как ядро, так и функциональные митохондрии – фундаментальное отличие от клеток млекопитающих. Это ставит важный вопрос в области сравнительной физиологии: как протекает окислительный стресс в эритроцитах птиц и каковы его механизмы по сравнению с млекопитающими? Понимание сходств и различий в клеточных ответах на окислительный стресс, который является значимым фактором, влияющим на жизнеспособность и функциональность клеток, в том числе в процессе старения, представляет существенный научный интерес [2]. В связи с этим, данная работа посвящена исследованию реакции эритроцитов птиц на клеточный стресс, уделяя особое внимание тому, как присутствие ядра и митохондрий влияют на развитие и исход стрессового ответа.

Методика. Объектом исследования были отмытые эритроциты одомашненного перепела (*Coturnix japonica*) Техасской белой породы. В эксперименте были использованы взрослые самки (n= 12). Исследования с использованием крови перепелов были одобрены Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) (№1-2/2024 от 31.01.2024г). Взятие крови производили из плечевой вены в шприцы с 200 мкл цитрата натрия с добавлением 3 мМ EGTA. Объем собранной крови составлял 150-300 мкл. Эритроциты центрифугировали трижды в HEPES буфере 5 минут 50 rpm при 25ºC. Отмытые эритроциты ресуспензировали в буфере с 2 мМ Ca^{2+} и доводили до концентрации $0.1*10^9$ клеток/мл (соответствует 1.5-2% гематокрита). Окислительный стресс *in vitro* вызывали добавлением терт-бутилпероксида (tbH) в конечных концентрациях 0.1, 0.5, 1 и 1.5 мМ. Кальциевый стресс, выражающийся в повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, вызывался ионофором кальция A23187 (5 мкМ) в буфере HEPES с 2 мМ кальция.

Проточная цитометрия была использована для анализа трансформации эритроцитов и образования микрочастиц, индуцированных ОС. Все эксперименты по проточной цитометрии проводились на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) с анализом не менее 20 000 событий. Для анализа размера и структуры эритроцитов использовали режим прямого рассеяния (FSC)/бокового рассеяния (SSC), который предоставляет информацию о размере и структуре клеток. Интенсивность света, рассеянного в прямом направлении (FSC), коррелирует с размером клеток. Интенсивность рассеянного света, измеренная под прямым углом или при боковом рассеянии (SSC), коррелирует с внутренней сложностью, детализацией и преломляющей способностью. Кластеризацию белка полосы-3 (анионный транспортер) и экстернализацию фосфатидилсерина (PS) на поверхности клеток оценивали с использованием флуоресцентных зондов с эозин-5-малеимидом (EMA) (0,07 мМ, 40 мин) и аннексином-V (0.1 мкг/мл, 15 мин, 25°C), соответственно. Изменение потенциала митохондриальной мембраны оценивали с использованием флюоресцентного красителя Родамин-123.

Спектры поглощения гемоглобинов (птицы содержат два типа: HbA и HbD; Hbs) регистрировали на спектрофотометре SPECS SSP-715-M (ООО «Спектроскопические системы», Москва, Россия) в диапазоне длин волн 300-700 нм с шагом 1 нм при 25°C. Чтобы изучить трансформацию Hbs в клетках, мы инкубировали эритроциты с окислителем в течение указанного времени, а затем клетки подвергали гипоосмотическому лизису и сканировали спектры свободных Hbs.

Для оценки осмотической хрупкости эритроцитов мы использовали новый метод лазерной дифракции (лазерный анализатор микрочастиц LaSca-T, ООО «БиоМедСистемы», Санкт-Петербург, Россия), адаптированный для физиологии клеток, согласно Миндукшеву и соавт. [3]. Интенсивность рассеянного света непрерывно определялась путем прямого рассеяния под различными углами. Эритроциты ($0.1*10^9$ клеток/мл) инкубировали при указанных концентрациях tbH в указанное время. Затем аликвоты (10 мкл) каждого образца ресуспендировали в 1 мл буфера HEPES для проведения теста на осмотическую хрупкость. Кривые гемолиза были зарегистрированы для диапазона осмоляльности от 315 до 80 мОсм/кг H_2O. Для каждого этапа измерения осмоляльности мы добавляли в образец соответствующий объем воды и эритроцитов, чтобы поддерживать концентрацию эритроцитов постоянной. По кривым гемолиза были рассчитаны следующие параметры: H50 - показатель осмотической хрупкости, представляющий концентрацию физиологического раствора, которая вызывает 50%-ный лизис; W - ширина распределения.

Данные представлены в виде среднего значения ± SD. Наши переменные соответствовали нормальному распределению (критерий Шапиро–Уилка, $p > 0.05$). Для сравнений мы использовали t-тест Стьюдента для независимых выборок. Статистически значимым считалось значение $p < 0.05$.

Результаты. Эритроциты перепела ($0.1*10^9$ клеток/мл) подвергали воздействию трет-бутилгидропероксида (tbH). Анализ клеточных изменений проводили через 0.5, 1, 3 и 6 часов инкубации. Было установлено, что характер и степень индуцированных изменений зависели как от концентрации tbH, так и от продолжительности воздействия.

Для анализа изменений эритроцитов использовали проточную цитометрию. Для оценки разных типов трансформации мы разделили популяцию клеток на четыре гейта: нормальные клетки, ригидные клетки, маленькие микрочастицы и средние микрочастицы (рис. 1).

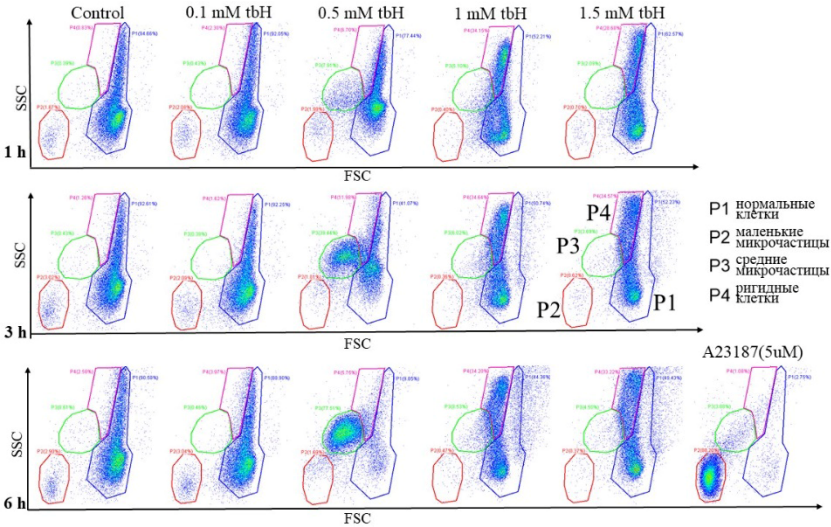


Рис. 1. Трансформация эритроцитов перепела под действием tbH. Гейт P1 представляет нормальные (неизмененные) клетки, P2 – микрочастицы маленького размера, P3 – микрочастицы среднего размера, P4 – ригидные клетки. Репрезентативные точечные графики из двенадцати независимых экспериментов.

В контрольной группе 90% эритроцитов находились в гейте «нормальные клетки» на протяжении 6 часов. Спустя 1 час воздействия 0.5 мМ tbH клетки образуют «средние микрочастицы», количество которых спустя 6 часов достигает 70% от всей популяции (рис. 2). Увеличение внутриклеточной концентрации кальция (5 мкМ A23187) в

течение 1 часа вызывало распад более половины эритроцитов (66.6%) на «маленькие микрочастицы» (рис. 1), в то время как применение tbH не приводило к значительному образованию «маленьких микрочастиц» (рис. 2).

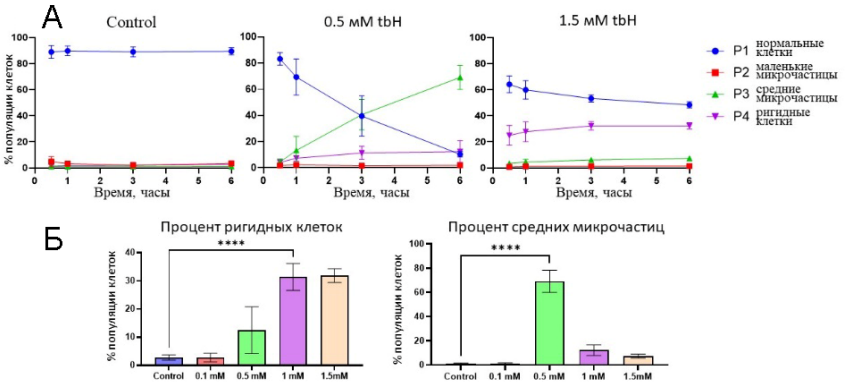


Рис. 2. Изменение состава клеточной популяции эритроцитов в зависимости от дозы и времени воздействия tbH. А. Изменение соотношения типов эритроцитов в зависимости от времени воздействия tbH. Б. Количество «ригидных клеток» и «средних микрочастиц» после 6 часов воздействия tbH. Данные представлены в виде среднего значения ± SD (n=12).

$HbFe^{2+}$ во время ОС может окисляться с образованием $HbFe^{3+}$ (трехвалентного железа Hb, метгемоглобина, MetHb), $HbFe^{4+}$ (феррилового Hb) и $HbFe^{4+}$ (феррилового радикала). Эти окислительно нестабильные промежуточные соединения Hb (феррил/ферриловые белковые радикалы, называемые гемихромами, HbChr) окисляют остатки в цепях глобина Hb (и других белках, находящихся поблизости), что в конечном итоге приводит к деградации Hb и потере гема [5]. Влияние окислительного стресса на гемоглобины проверяли спектрофотометрически. Эритроциты были окислены, затем лизированы в гипоосмотических условиях и отсканированы их спектры (данные не представлены). Окисление гемоглобинов вызывала даже самая низкая концентрация tbH – 0.1 мМ, метгемоглобин, который образовывался за первые полчаса, восстанавливался и к 6 часу воздействия, спектр гемоглобинов не отличался от контроля. tbH в концентрации 0.5 мМ вызывал постепенное усиление окисления гемоглобинов, а высокие концентрации (1-1.5 мМ) окисляли гемоглобины быстро и безвозвратно до гемихромов. «Микрочастицы среднего размера», вызванные 0.5 мМ tbH, содержали феррильные формы Hbs, в то время как «микрочастицы

маленького размера», полученные действием A23187, не содержали каких-либо существенного количества форм гемоглобинов.

Для характеристики вызванных окислительным стрессом трансформации эритроцитов и возможные изменения деформируемости мы использовали тест на осмотическую резистентность. Осмотическая устойчивость эритроцитов является составным показателем их формы, гидратации и, при определенных ограничениях, склонности к разрушению in vivo у млекопитающих [6]. Мы использовали оригинальный метод анализа осмотической резистентности клеток (описан в разделе методы). Обработка tbH в концентрации 0.5 мМ привела к постепенному снижению H50 (осмоляльности, при которой происходит гемолиз 50% клеток), что отражает повышение жесткости мембран, а высокие дозы (1-1.5 мМ) вызывали ригидность эритроцитов мгновенно (рис. 3) по сравнению с контрольными клетками. Кроме того, 0.5 мМ tbH увеличивала ширину распределения клеток (W). Оба параметра убедительно свидетельствовали о значительном снижении деформируемости эритроцитов и увеличении их неоднородности при воздействии 0.5 мМ tbH.

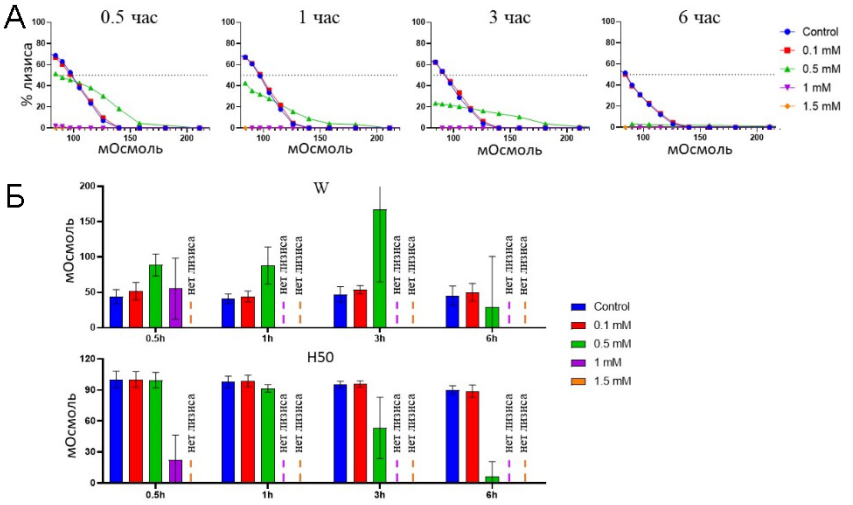


Рис. 3. Снижение осмотической резистентности эритроцитов птиц в течение указанного времени, в диапазоне от 220 до 80 мОсмоль HEPES буфера. А. Количественная оценка процента гемолиза по результатам теста на осмотическую резистентность, рассчитанная на основе шести независимых экспериментов. Б. W – ширина распределения клеток; H50 – осмоляльность, при которой происходит гемолиз 50% клеток. Данные представлены в виде среднего значения ± SD (n=6).

Экстернализацию PS вызванную окислительным стрессом регистрировали с помощью связывания аннексина V. Мы сравнили процент клеток, позитивных по аннексину V в разных гейтах (рис. 4). Обработка tbH 0.5-1.5 мМ значительно увеличил экстернализацию PS в гейтах «нормальных» и «ригидных клеток». Наибольшим сродством к аннексину V обладают клетки из гейта «средних микрочастиц»; даже небольшое количество контрольных клеток из гейта «средних микрочастиц» в 40-50% случаях связывали аннексин V.

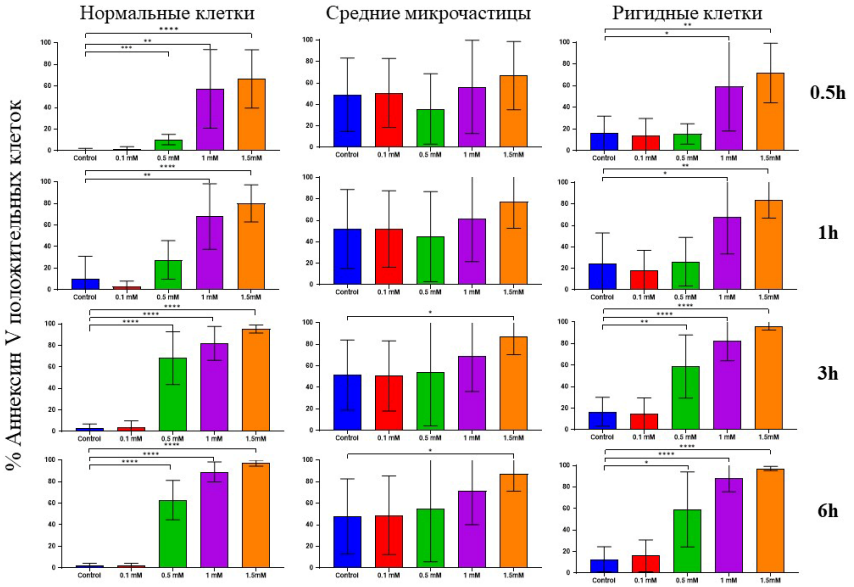


Рис. 4. Экстернализация фосфотидилсерина при действии tbH. Процент положительно связанных с аннексином V клетки/микрочастицы в гейтах P1 – нормальные клетки, P3 – средние микрочастицы, P4 – ригидные клетки. Данные представлены в виде среднего значения ± SD (n=6), т-тест Стьюдента. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем, **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем.

Кластеризация белка полосы-3 является одним из важных сигналов для устранения стареющих и патологических эритроцитов. Окисление белка полосы-3 и диссоциация спектрина от цитоскелета, что в последствии приводит к повышенной подвижности и образованию кластеров полосы-3 [7,8]. В наших экспериментах мы проверили, вызывает ли окисление эритроцитов tbH кластеризацию полосы-3, применив тест на связывание EMA. В контрольных клетках EMA

демонстрировал слабую однородную флуоресценцию (рис.5). Окислительный стресс в эритроцитах, индуцированный tbH, вызывал кластеризацию полосы-3 (рис. 5). Наибольшую флюоресценцию можно наблюдать в гейте «средних микрочастиц» при воздействии 0.5 мМ tbH на протяжении 6 часов. Напротив, A23187 не вызывал ни образования микрочастиц «среднего размера», ни кластеризации белка полосы 3 (данные не представлены).

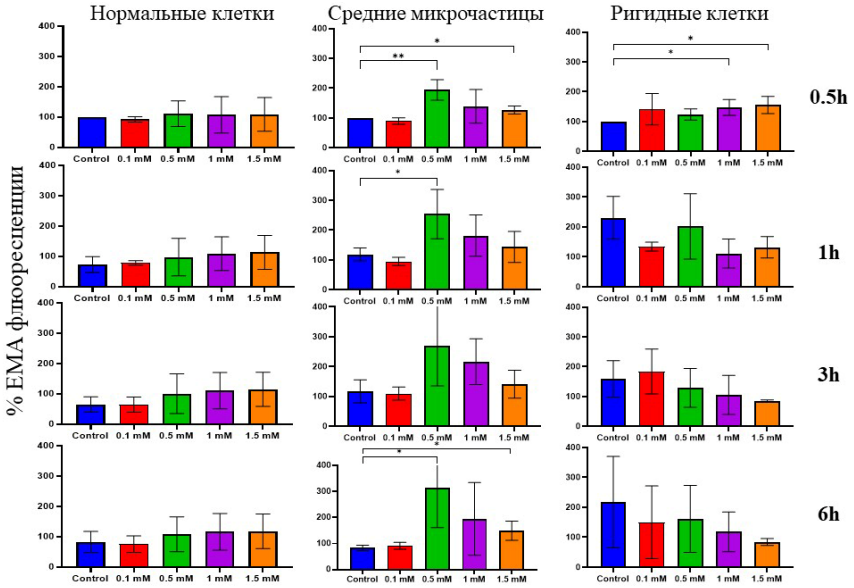


Рис. 5. Кластеризация белка полосы-3 при действии tbH. Количественная оценка данных проточной цитометрии. За 100% принимается контроль для 0.5 часов в серии экспериментов. Данные представлены в виде среднего значения ± SD (n = 6), т-тест Стьюдента. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Изменений потенциала митохондриальной мембраны на данном этапе исследований не выявлено, возможно понадобится методическое уточнение измерений в данных условиях (данные не представлены).

Заключение. Результаты настоящего исследования показали, что индуцированный окислительный стресс вызывает морфологическую трансформацию эритроцитов птиц и образование микрочастиц. Ключевые события включают окисление гемоглобинов, кластеризацию белка полосы-3 и реорганизацию цитоскелета. Полученные данные свидетельствуют о том, что при умеренной интенсивности окислительного

стресса (0.5 мМ tbH) везикуляция выступает как механизм удаления окисленного гемоглобина из клетки. Этот гемоглобин эффективно инкапсулируется внутри образующихся микрочастиц, вследствие своего повышенного сродства к клеточной мембране. Воздействие высоких концентраций окислителя (1-1.5 мМ tbH) приводит преимущественно к ригидности эритроцитов. Важно отметить, что данный механизм ответа на окислительный стресс в ядерных эритроцитах птиц демонстрирует существенное сходство с процессами, характерными для безъядерных эритроцитов человека, указывая на возможные консервативные стратегии клеточной защиты, несмотря на фундаментальные различия в их субклеточной организации.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00263-25-00 (FMMM-2025-0014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sudnitsyna JS, Skverchinskaya EA, Dobrylko IA, Nikitina ER, Gambaryan SP, Mindukshev IV. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(10):929.
2. Stier, Antoine, et al. Avian erythrocytes have functional mitochondria, opening novel perspectives for birds as animal models in the study of ageing. *Frontiers in zoology* 2013;10:1-9.
3. Mindukshev IV, Sudnitsyna JS, Skverchinskaya EA, Andreyeva AY, Dobrylko IA, Senchenkova EY, Krivchenko AI, Gambaryan SP. Erythrocytes' Reactions to Osmotic, Ammonium, and Oxidative Stress Are Inhibited under Hypoxia. *Biochem (Moscow). Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol*. 2019;13:352–364.
4. Mindukshev IV, Kudryavtsev I., Serebriakova M., Trulioff A., Gambaryan SP, Sudnitsyna JS, Khmelevskoy D., Voitenko N., Avdonin P., Jenkins R., et al. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals. In: Gupta R.C., editor. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity.* 2016;24:319–332.
5. Chintagari, Narendranath Reddy, Sirsendu Jana, and Abdu I. Alayash. Oxidized ferric and ferryl forms of hemoglobin trigger mitochondrial dysfunction and injury in alveolar type I cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2016;55(2):288-298.
6. Walski T, Chludzińska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *BioMed Research International.* 2014;1:162102.
7. Jana S, Strader MB, Meng F, Hicks W, Kassa T, Tarandovskiy I, De Paoli S, Simak J, Heaven MR, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemoglobin oxidation–dependent reactions promote interactions with band 3 and oxidative changes in sickle cell–derived microparticles. *JCI insight*. 2018;3(21):120451.
8. Shimo H, Arjunan SN, Machiyama H, Nishino T, Suematsu M, Fujita H, Tomita M, Takahashi K. Particle simulation of oxidation induced band 3 clustering in human erythrocytes. *PLOS Computational Biology*. 2015;11(6):1004210.

РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ НАКОПЛЕНИИ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ В ГЕПАТОЦИТАХ

Дмитриева С.А.[1], Гиниятуллина Д.М.[2], Вологин Д.С.[1], Пономарева А.А.[1]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия
[2]Казанский Федеральный (Приволжский) университет, Казань, Россия

Введение. Развитие неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) обусловлено спектром различных молекулярных факторов, приводящих на начальном этапе к избыточному накоплению липидных капель (ЛК) в гепатоцитах [1]. Высококалорийное питание, в котором преобладают жиры и углеводы, приводит в дальнейшем к развитию ожирения и инсулинорезистентности (ИР), которые являются предрасполагающими факторами в развитии данной патологии, однако НАЖБП может протекать и без развития ожирения и ИР [2]. Ключевую роль в патофизиологии НАЖБП играют нарушения редокс-метаболизма, развитие окислительного стресса и митохондриальная дисфункция, которая на ультраструктурном уровне выражается в нарушении структуры митохондрий, в изменении ультратонких взаимодействий между ними и другими органеллами [3]. В настоящей работе стеатоз (накопление ЛК) в печени лабораторных животных индуцировали: 1) высокожировым питанием и 2) пероральным введением окситетрациклина. Целью исследования был анализ редокс-метаболизма в тканях печени и количественных изменений в содержании ТГ в сыворотке крови и тканях печени мыши при разных моделях развития стеатоза в гепатоцитах печени лабораторных животных.

Материалы и методы. Исследование проводилось на трехмесячных самцах белых лабораторных мышах линии CD1. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии экспериментов животные в течение 3 суток перорально получали антибиотик окситетрациклин (0,5 г/кг), который приводит к жировому перерождению печени за счет ингибирования бета-окисления в митохондриях [4]. Во второй серии экспериментов животные в течение 3 месяцев находились на высокожировой диете, которая индуцирует стеатоз печени благодаря избыточному поступлению липидов в организм вместе с пищей [5]. Забор и фиксацию тканей и крови всех групп животных проводили после 8-часового голодания. Для биохимических исследований использовали сыворотку крови и ткани, которые были мгновенно заморожены в жидком азоте и хранились в морозильной камере при -80ºС до начала

эксперимента. Фиксацию тканей проводили по стандартной методике, ультраструктурные изменения в гепатоцитах анализировали с помощью с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7800 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Япония). Прибор относится к материально-технической базе «Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН». Определение содержания триглицеридов (ТГ), холестерина, аспартат- и аланинаминотрансфераз (АСТ и АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) анализировали в сыворотке крови с помощью коммерческих наборов (Ольвекс-Диагностикум, Россия). Концентрацию ТГ в гомогенатах тканей определяли с помощью набора Triglyceride Assay Kit на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США) при 570 нм. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли в растворимой фракции гомогената тканей печени по изменению содержания малонового диальдегида (МДА). Работа была проведена в соответствии с директивой ЕС 2010/63/ЕС и одобрена протоколом этической комиссией ФИЦ Казанского научного центра РАН № 23/7 от 12.05.2023. В каждой серии экспериментов анализировали также исходное состояние печени и сыворотки крови лабораторных животных. В каждой проводимых серии данные контрольных групп достоверно не изменялись относительно исходных вариантов. На рисунках и в таблице данные представлены относительно исходного уровня, как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическая обработка результатов производилась с использованием критерия Манна-Уитни для непараметрических выборок. Звездочкой отмечены статистически значимые от исходного уровня отличия ($P < 0,05$).

Результаты. В наших исследованиях показано, что достоверное увеличение содержания ЛК в гепатоцитах наблюдалось, как при трехсуточном пероральном применении окситетрациклина, так и при нахождении животных в течение 3 месяцев на ВЖД (рис. 1Б,В). Накопление ЛК в гепатоцитах сопровождалось в обоих экспериментальных вариантах накоплением аутофагических вакуолей и лизосом в цитоплазме (рис. 1Б,В). Интересно, что окситетрациклин индуцуцировал накопление электронно-плотных ЛК (рис. 1Б), а при ВЖД наблюдали более электронно-прозрачные ЛК (рис. 1В). Различия в окраске ЛК опосредованы различными осмиофильными свойствам химических соединений в составе данных образований. Накопление ЛК в гепатоцитах сопровождалось достоверным повышением содержания ТГ в тканях печени, но достоверно не различалось между вариантами (рис. 1Б,В, рис. 2А). Напротив, достоверное увеличение содержания ТГ в сыворотке крови происходило только при ВЖД (таблица). В данной экспериментальной группе достоверно увеличивалось также содержание

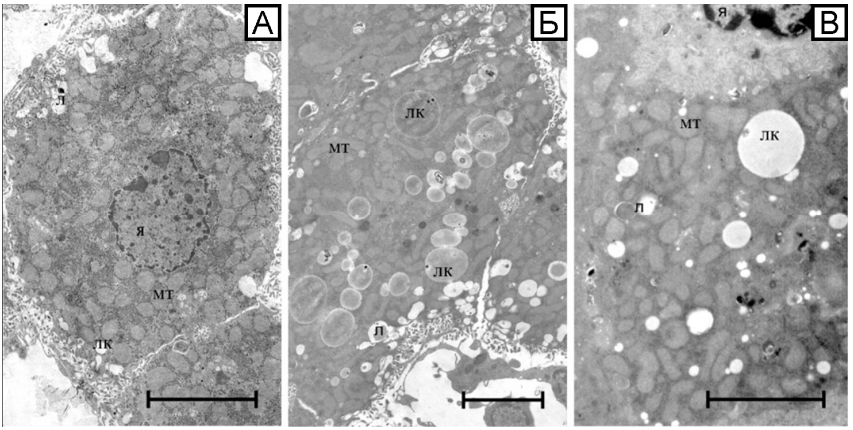


Рис. 1. Накопление липидных капель в клетках печени мыши: А – общий вид гепатоцита в печени мыши (исходный вариант), Б – действие окситетрациклина (3 суток), В – высокожировая диета (3 месяца). Сокращения: л – лизосома, лк – липидная капля, мт – митохондрия, я – ядро. Масштабный отрезок равен 5 мкм.

Таблица. Биохимические показатели сыворотки крови мыши при действии окситетрациклина и при ВЖД

Показатели	Исходная группа	Окситетрациклин	ВЖД
АЛТ, мкмоль/(с×л)	0,53 ± 0,09	0,51 ± 0,21	0,59 ± 0,19
АСТ, мкмоль/(с×л	0,54 ± 0,10	0,49 ± 0,16	0,57 ± 0,09
ЩФ, нмоль/(с×л)	494,63 ± 24,27	489 ± 25,66	475,80± 30,85
ЛДГ, ед/л	370,29 ± 32,58	360,88 ± 31,49	374,30 ± 34,88
Холестерин, ммоль/л	2,17 ± 0,69	1,96 ± 0,72	4,00 ± 0,75*
ТГ, ммоль/л	0,95 ± 0,32	1,21 ± 0,44	1,36 ± 0,28*

холестерина (таблица). А при пероральном применении окситетрациклина содержание ТГ и холестерина в плазме крови достоверно не отличалось от исходного уровня (таблица). Содержание трансаминаз (аспартат- и аланинаминотрансфераз – АСТ, АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) достоверно не изменялись в двух сериях экспериментов (таблица). При накоплении ЛК в гепатоцитах происходило изменение редокс-метаболизма в тканях печени, в частности увеличивается уровень ПОЛ (рис. 2Б), что свидетельствует о развитии в

тканях печени окислительного стресса, как при действии окситетрациклина, так и при ВЖД. При этом уровень ПОЛ увеличивается более значительно при 3 суточном пероральном применение окситетрациклина. Таким образом, накопление ЛК при действии окситетрациклина и ВЖД сопровождается нарушением редокс-метаболизма.

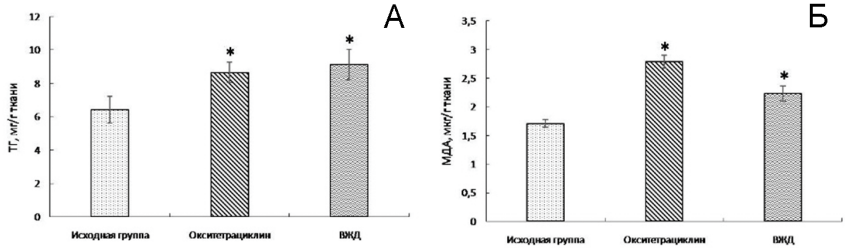


Рис. 2. Уровень ТГ (А) и ПОЛ (Б) в тканях печени мыши при накоплении ЛК в гепатоцитах

Обсуждение. Окситетрациклин и ВЖД индуцируют накопление ЛК в гепатоцитах печени, что является одним из начальных этапов НАЖБП. Мы полагаем, что различия в структуре ЛК, выявленные с помощью электронной микроскопии (рис. 1Б,В) обусловлены различными механизмами изменения липидного метаболизма печени при индуцировании стеатоза в наших экспериментах, в том числе влиянием на различные этапы биогенеза ЛК [6]. Накопление ЛК не сопровождалось повреждением печени, так как активность АЛТ, АСТ и ЩФ достоверно не изменялись (таблица). Это согласуется с данными литературы, что на ранних стадиях НАЖБП обычно протекает бессимптомно и не сопровождается повреждением тканей печени [1] и позволяет использовать данные модели для индукции ранних стадий заболевания. Считается, что митохондриальная дисфункция и изменение редокс-метаболизма вносят важный вклад как при стеатозе, так и при прогрессировании НАЖБП [3]. Наши данные показали, что накоплении ЛК сопровождается изменением редокс-метаболизма и развитием окислительного стресса в тканях печени (рис. 2Б). Известно, что процессы аутофагии способствуют предотвращению развития окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума, замедляют жировое перерождение печени за счет усиленного удаления ЛК и поврежденных органелл в процессах селективной аутофагии – митофагии, ретикулофагии и липофагии [7], а нарушение процессов аутофагии способствует развитию НАЖБП [8]. Накопление аутофагосом, выявленное в наших

экспериментах, может свидетельствовать, как об активации процесса, так и об его ингибировании на одной из финальных стадий [9]. Дальнейшие исследования позволят выяснить однонаправленно ли изменяется активность процессов аутофагии при разных вариантах индуцирования стеатоза в печени лабораторных животных, и вовлечено ли ее ингибирование в начальные этапы заболевания. Полученные в настоящей работе данные подтверждают увеличение количества ЛК и отсутствие повреждения печени, что позволяет использовать данные экспериментальные условия для моделирования начальных стадий НАЖБП.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного Фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 24-25-20086.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nalbantoglu IL, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9026-9037.
2. Semova I, Biddinger SB. Triglycerides in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Guilty Until Proven Innocent. *Trends Pharmacol Sci*. 2021;42(3):183-190
3. Minami Y, Hoshino A, Higuchi Y, Hamaguchi M, Kaneko Y, Kirita Y, Taminishi S, Nishiji T, Taruno A, Fukui M, Arany Z, Matoba S. Liver lipophagy ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through extracellular lipid secretion. *Nat Commun*. 2023;14(1):4084.
4. Gnanasoundari, M., & Pari, L. (2006). Impact of Naringenin on Oxytetracycline-Mediated Oxidative Damage in Kidney of Rats. *Renal Failure*, *28*(7), 599–605.
5. Flessa CM, Nasiri-Ansari N, Kyrou I, Leca BM, Lianou M, Chatzigeorgiou A, Kaltsas G, Kassi E, Randeva HS. Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15791.
6. Zadoorian A, Du X, Yang H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2023;19(8):443-459
7. Minami Y, Hoshino A, Higuchi Y, Hamaguchi M, Kaneko Y, Kirita Y, Taminishi S, Nishiji T, Taruno A, Fukui M, Arany Z, Matoba S. Liver lipophagy ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through extracellular lipid secretion. *Nat Commun.* 2023;14(1):4084.
8. Wu W. K., Zhang L., Chan M. T. V. Autophagy, NAFLD and NAFLD-Related HCC. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1061:127-138.
9. Singh B, Bhaskar S. Methods for Detection of Autophagy in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol.* 2019;2045:245-258.

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НИМЕСУЛИДА НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ СТРУКТУПНЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ МИТОХОНДРИЙ

Дмитриева С.А.[1], Гумерова А.И.[2], Пономарева А.А.[1]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия
[2]Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Нимесулид относится к нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), имеет высокую терапевтическую эффективность для быстрого купирования боли, стойкого длительного снижения высокой температуры, а также при симптоматическом лечении острых и хронических неинфекционных и инфекционных заболеваний, сопровождающихся воспалением [1]. По сравнению с другими НПВП нимесулид является атипичным препаратом и его применение характеризуется самым высоким риском развития лекарственного поражения печени (ЛПП) [2]. Чрезмерное и/или длительное применение нимесулида увеличивает риск передозировки и развития побочных эффектов, в том числе ЛПП. Показано, что нимесулид-индуцированная гибель гепатоцитов сопровождается ярко-выраженной митохондриальной дисфункцией, а сам нимесулид обладает прямым повреждающим действием на митохондрии печени, которое обусловлено его ингибирующими и разобщающими свойствами [3]. В настоящее время механизмы действия нимесулида, как при токсическом, так и при терапевтическом действии, изучены недостаточно и нуждаются в дополнительных экспериментальных исследованиях. Мы полагаем, что в основе действия нимесулида может лежать его митохондриально-направленный эффект, который сопровождается структурно-функциональными изменениями в митохондриях, что может приводить не только к повреждению и гибели клеток, но и к активации адаптивных механизмов в клетке. В связи с этим, особую важность имеет изучение редокс-метаболизма и структурно-функциональных изменений митохондрий при действии нимесулида в условиях in vivo. В настоящем исследовании мы проанализировали изменение активности супероксиддисмутазы (СОД), уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ультраструктуру митохондрий в тканях печени мыши при действии терапевтической и высокой концентраций нимесулида.

Материалы и методы. Исследование проводилось на трехмесячных самцах белых лабораторных мышах линии CD1, которых

содержали в клетках 22 × 30 × 16 см при постоянной температуре 22-24°С, в режиме освещения день/ночь (12/12 ч) при неограниченном доступе к чистой питьевой воде и еде (полнорационный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» для лабораторных животных ПК 120-2_46). Анализировали состояние печени трех групп животных: с первой (контрольной) группой не проводилось никаких манипуляций, вторая группа – получала перорально нимесулид в терапевтической концентрации 5 мг/кг в течение 5 суток, третья группа – получала перорально нимесулид в высокой токсической [4] концентрации 200 мг/кг в течение 5 суток. Фиксацию тканей для микроскопии и биохимические исследования проводили, как описано ранее [5]. Анализ ультраструктуры клеток печени осуществляли с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7800 (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Япония). Прибор относится к материально-технической базе «Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН». Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли в растворимой фракции гомогената тканей печени с помощью спектрофотометрических методов на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США). 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 значение ± стандартное отклонение. Статистическая обработка результатов производилась с использованием критерия Манна-Уитни для непараметрических выборок. Звездочкой отмечены статистически значимые от контроля отличия ($P < 0,05$).

Результаты. При анализе клеток с помощью электронной микроскопии были выявлены расширения межклеточных контактов, которые при действии высокой концентрации нимесулида были более значительными. Кроме вышеизложенного, мы не выявили иного повреждающего действия нимесулида на гепатоциты: ультраструктура клеток незначительно отличалась от классического типа, описанного в научной литературе [6]. Общая структура ткани была интактна, хорошо просматривались границы соседних гепатоцитов, эндотелиальные клетки капилляров, желчные канальцы. Нимесулид ни в одной из исследованных концентраций не оказал повреждающего действия на митохондрии, хотя и приводил к изменению их структуры: наблюдали удлинение формы большей части органелл, которое было более выражено при действии высокой концентрации (рис. 1В). При действии терапевтической концентрации нимесулида наблюдали незначительное разрастание канальцев шероховатового ЭР (рис. 1Б).

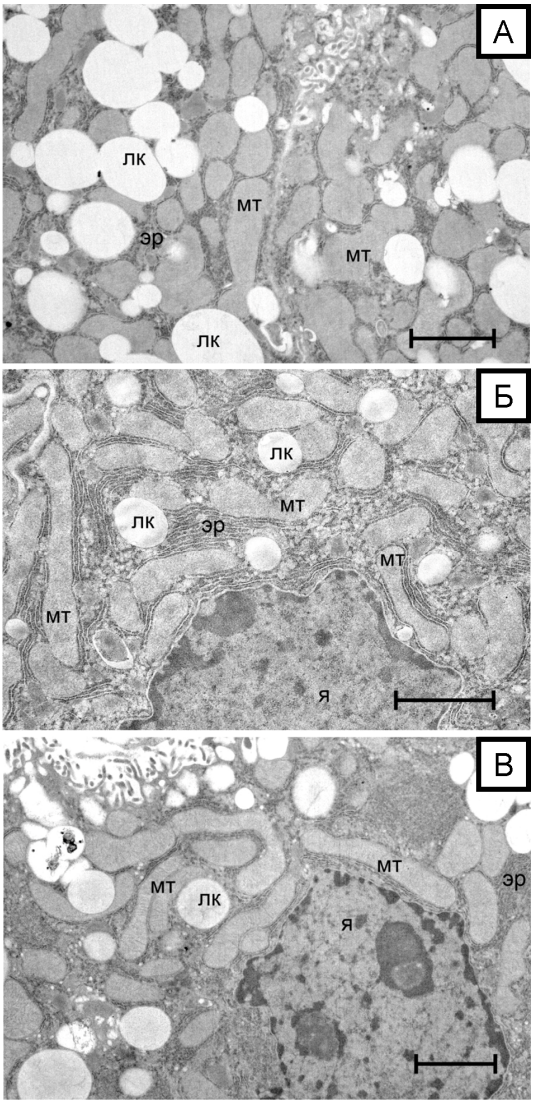


Рис. 1. Влияние нумесулида на ультраструктуру клеток печени мыши: А – гепатоциты контрольной группы, Б – действие нумесулида 5 мг/кг, В – действие нумесулида 200 мг/кг. Сокращения: лк – липидная капля, мт – митохондрия, эр – эндоплазматический ретикулум, я – ядро. Масштабный отрезок – 2 мкм.

Несмотря на отсутствие повреждающего действия на гепатоциты, при действии нимесулида в концентрации 200 мг/кг в тканях печени значительно увеличивался уровень ПОЛ (рис. 2А), что, несомненно, свидетельствует о развитии окислительного стресса при действии высокой концентрации. Достоверно значимым являлось также усиление активности СОД (рис. 2Б), при этом активация СОД при действии нимесулида в концентрации 5 мг/кг была более значительной, чем при действии нимесулида в концентрации 200 мг/кг.

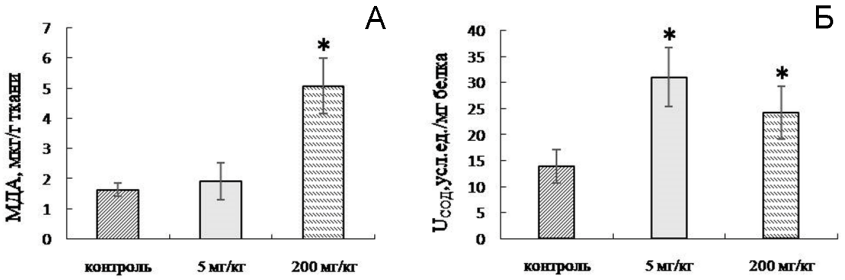


Рис. 2. Уровень ПОЛ (А) и активность СОД (Б) в тканях печени мыши при действии нимесулида.

Таким образом, при действии терапевтической и высокой концентраций нимесулида происходят изменение редокс-метаболизма в тканях печени, что сопровождается усилением активности СОД, а при действии высокой концентрации – развитие окислительного стресса. Однако даже применение высокой концентрации нимемесулида не приводило к значительному повреждающему действию на клетки и митохондрии (основные АФК – генерирующие органеллы), что может свидетельствовать о включении адаптационно-компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию редокс-метаболизма, измененного действием нимесулида.

Обсуждение. Применение нимесулида запрещено в ряде стран, несмотря на то, что гепатотоксичность, вызванная нимесулидом, встречается редко (один случай на миллион пациентов), относительно нечувствительна к накопленной дозе и развивается как идиосинкразическое ЛПП, при этом на гепатоцеллюлярное повреждение приходится 65% всех случаев, на холестатическое – 12 %, на смешанное – 21% [7]. Применение высоких концентраций нимесулида используется в научных исследованиях для индуцирования повреждения печени, которое сопровождается развитием окислительного стресса [8]. Однако существует и противоположные данные о том, что нимесулид при пероральном введении снижает уровень ПОЛ, увеличивает содержание

GSH и способен предотвращать окислительный стресс в печени крыс при ишемическом реперфузионном повреждение [9]. Таким образом, наши данные по активации СОД и развитию окислительного стресса при пероральном применении высокой концентраций нимесулида в течение 5 суток согласуются с данными научной литературы. Мы полагаем, что активация антиоксидантной защиты клеток обусловлено необходимостью детоксикации повышенной генерации АФК при действии нимесулида [10]. Интересно, что, несмотря на различный уровень окислительного стресса, состояние основных АФК-продуцирующих органелл – митохондрий, после 5 суток действия различных концентраций нимесулида достоверно не различался, что свидетельствует об их адекватной работе для поддержания стабильного энергетического и редокс-метаболизма в печени. Отсутствие в гепатоцитах поврежденных митохондрий после применения высокой концентрации нимесулида, в частности таких характерных деструктивных изменений в органеллах как просветление, набухание матрикса и повреждение мембран, может свидетельствовать на наш взгляд о включении двух адаптационных механизмах. Во-первых, нимесулид может активировать процессы аутофагии, направленной на удаление из метаболизма клетки окисленных и поврежденных структур, в том числе поврежденных или сверх-генерирующих АФК митохондрий (при активации процессов митофагии). В настоящее время неизвестно, может ли нимесулид модулировать процессы митофагии, однако способность нимесулида активировать аутофагические процессы, повышая экспрессию аутофагических белков и генов показана в ряде исследований [4,11,12]. Во-вторых, динамические преобразования митохондрий с помощью регулируемых процессов слияния/деления, в наших экспериментах – образование удлиненных митохондрий при действии нимесулида (рис. 1Б,В) позволяют модулировать эффективность переноса электронов и могут способствовать нормализации редокс-метаболизма в митохондриях. Между функциональным состоянием митохондрий, процессами митохондриального слияния/деления и митофагией существует тесная взаимосвязь, которая формирует механизмы клеточной адаптации и во многом определяет дальнейшую судьбу клетки. Однако в настоящее время клеточные и молекулярные механизмы этих процессов и их вклад в энергетический и редокс-метаболизм при терапевтическом и токсическом действии нимесулида изучены недостаточно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что даже при действии высокой концентрации нимесулида и развитии в тканях печени окислительного стресса митохондрии сохраняют свою структурно-функциональную целостность. Это подтверждает необходимость дальнейших исследований влияния нимесулида на ряд адаптационных

механизмов, что позволит более детально охарактеризовать до конца нерасшифрованные механизмы терапевтического действия данного НПВП, а также выявить возможные причина нимесулид-индуцированной гибели клеток и развития при его применении идиосинкразического ЛПП.

Работа выполнена в рамках госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tiwaskar M, Charde S, Balankhe N, Hegde A, Deodhar M, Gondane A, Pawar D, Sharma A. Nimesulide: Critical Appraisal of Safety and Efficacy in Acute Pain. J Assoc Physicians India. 2025;73(3):e22-e28.
2. Kwon J, Kim S, Yoo H, Lee E. Nimesulide-induced hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2019;14(1):e0209264.
3. Rana P, Aleo MD, Wen X, Kogut S. Hepatotoxicity reports in the FDA adverse event reporting system database: A comparison of drugs that cause injury via mitochondrial or other mechanisms. Acta Pharm Sin B. 2021;11(12):3857-3868.
4. Nguyen V, Huang J, Doan V, Lin X, Tang X, Huang Y, Tang A, Yang X, Huang R. Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against nimesulide-induced liver injury in mice. J Ethnopharmacol;172:273-80.
5. Дмитриева СА, Пономарева АА. Редокс-состояние и накопление аутофагосом в печени мыши при действии хлорида лития. Цитология. 2025;67(1):30-41.
6. Bruni C, Porter KR. The Fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver: I. general observations. Am. J. Pathol. 1965,46:691-755.
7. Bessone F, Hernandez N, Mendizabal M, Ridruejo E, Gualano G, Fassio E, Peralta M, Fainboim H, Anders M, Tanno H, Tanno F, Parana R, Medina-Caliz I, Robles-Diaz M, Alvarez-Alvarez I, Niu H, Stephens C, Colombato L, Arrese M, Reggiardo MV, Ono SK, Carrilho F, Lucena MI, Andrade RJ. Serious liver injury induced by Nimesulide: an international collaborative study. Arch Toxicol. 2021; 95(4):1475-1487.
8. Nguyen V, Huang J, Doan V, Lin X, Tang X, Huang Y, Tang A, Yang X, Huang R. Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against nimesulide-induced liver injury in mice. J Ethnopharmacol. 2015;172:273-280.
9. Demiryilmaz I, Turan MI, Kisaoglu A, Gulapoglu M, Yilmaz I, Suleyman H. Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. Pharmacol Rep. 20;66(4):647-652.
10. Maruf AA, O'Brien P. Inflammation-Enhanced Drug-Induced Liver Injury. Free Radic Biol Med. 2014;75(1):S40.
11. Niranjan R, Mishra KP, Thakur AK. Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Initiates Autophagy and Potentiates MPTP-Induced Autophagic Cell Death of Human Neuroblastoma Cells, SH-SY5Y: an Inside in the Pathology of Parkinson's Disease. Mol Neurobiol. 2018;55(10):8038-8050.
12. Tomaz V, Griesi-Oliveira K, Puga RD, Conti BJ, Santos FPS, Hamerschlak N, Campregher PV. Molecular Characterization of a First-in-Human Clinical Response to Nimesulide in Acute Myeloid Leukemia. Front Oncol. 2022;12:874168.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ МОНОМЕРНЫХ ЭЛЛАГОТАННИНОВ *IN VITRO*

Кабанов Д.С., Балеев Д.Н., Сидельников Н.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), Москва, Россия

Введение. Выявление природных биологически активных соединений является основной предпосылкой развития отечественной фармакологии и медицины. Эллаготаннины опознаны, как эффективные биологически активные полифенольные соединения растений, проявляющие противовирусное [1-3], противовоспалительное [4,5], бактерицидное [6] и цитотоксическое действие на опухолевые клетки *in vitro* (ОК) [7-10]. Сотрудниками Института ВИЛАР на основании фармацевтической композиции эллаготаннинов из листьев *Hippophae rhamnoides* L. (гиппофаин «В-2» > казуаринин > гиппофаин «В-1» > стахиурин > казуариктин, педункулагин, стриктинин и птерокаринин «А») разработан и выведен на торговый рынок лекарственный фитопрепарат «Гипорамин» («Hiporhaminum»), обладающий противовирусным действием [10,11]. Из литературных данных известно, что эллаготаннины фитопрепарата «Гипорамин» подавляют пролиферацию ОК *in vitro* [5,8,12-14]. В связи с этим, в Институте ВИЛАР проводятся исследования по сравнению цитотоксического действия суммарного пула эллаготаннинов из листьев *H. rhamnoides* на опухолевые и неопухолевые клетки человека *in vitro* [15]. Цитотоксическое (антипролиферативное) действие эллаготаннинов на ОК человека изучено недостаточно полно и, в настоящее время, актуализировано в отечественной и зарубежной фундаментальной онкологии [8-10,16,17]. В настоящей обзорной работе представлены наиболее известные молекулярные мишени и внутриклеточные сигнальные молекулы, опосредующие антипролиферативное действие эллаготаннинов на ОК человека *in vitro*. Значимость изучения биологической активности эллаготаннинов подчеркивается тем, что основные метаболиты эллаготаннинов микробиотой кишечника: эллаговая кислота и уролитины играют ключевую роль в нормализации обмена веществ и сохранении здоровья человека [8,18,19].

Молекулярные механизмы антипролиферативного действия мономерных эллаготаннинов. Пул молекулярных мишеней эллаготаннинов на поверхности плазматических мембран ОК человека постоянно пополняется [10,12,17,19-21]. Наиболее изучены онкофетальный рецептор ROR1 к плейотропному фактору роста Wnt-5a, рецептор к эпидермальному фактору роста (EGFR) и фактору роста

гепатоцитов HGF (c-Met), а также рецептор 67LR к ламинину, обнаруживающиеся в липидах «*rafts*» опухолевых клеток [17,19]. Перераспределение в липиды «*rafts*» рецепторов «смерти» (DR), включая CD95 и DR4/5 (TRAILR1/2), инициирующих TRAIL-опосредованный апоптоз ОК, а также полное разрушение структуры «*rafts*», необходимых для поддержания жизнеспособности и пролиферации клеток наблюдаются в ответ на полифенольные фитокомпоненты [22,23]. Эллаготаннины теллимаграндин I и корилагин индуцируют утраченную способность клетками HeLa, экспрессировать белки коннексины, формирующие «щелевые контакты» и обеспечивающие межклеточную коммуникацию, включая обмен вторичными мессенджерами (Ca^{2+}, cAMP, cGMP и IP_3) и т.о. подавляют пролиферацию ОК *in vitro* [24-26].

Корилагин «Corilagin» мономерный эллаготаннин, структурный аналог гераниина и давидиина. После ПО применения 1500/50 мг/кг (2 ч) корилагин обнаруживается в кровотоке экспериментальных животных (86,4/2,8 μM, $t_{1/2}$ 6 ч). Он не транспортируется через плазматическую мембрану клеток аденокарциномы ободочной кишки Caco-2 [27,28], однако ингибирует функцию интегрального гликопротеина CD44 и т.о. подавляет гликолиз и усиливает аэробное дыхание в митохондриях ОК яичников HOPM-Snail [7]. Он индуцирует экспрессию коннексина клетками аденокарциномы яичников SK-OV-3 и, возможно, активирует сигнальную систему PtdIns, индуцированной GPCR и PI3K I-сопряженными рецепторами к факторам роста [25,26]. Корилагин специфично подавляет конститутивную продукцию TGF-1β опухолевыми клетками SKOv3ip, Hey и HO8910PM [29]. Он повышает содержание лизосом и эндосом в клетках аденокарциномы желудка SGC7901 и BGC823, а также аденокарциномы молочной железы MCF-7, указывая на развитие аутофагии. Корилагин индуцирует внутриклеточную продукцию АФК [30] и экспрессию протеин киназы-3 (RIP3) опухолевыми клетками молочной железы SK-BR3, регулирующей развитие апоптоза. У клеток холангиокарциномы CCA корилагин подавляет экспрессию иРНК антиапоптозного белка Bcl-2 и клеточный цикл в G_2/M фазе [27,29], тогда как в клетках гепатокарциномы SMMC7721 и Bel7402 подавляет экспрессию протеин киназы cdc2 и регуляторного белка циклина B1, необходимых для перехода митоза из G_2 в M фазу [31]. Корилагин стимулирует экспрессию проапоптозного трансмембранного CD95, активирующего каспазу-8 (сигнальный путь Fas/FasL), снижает уровни фосфорилированной PI3K/AKT и усиливает экспрессию проапоптозного фактора транскрипции p53. Высвобождение цитохрома «С» митохондрий, активация каспаз-9 и -3 в ответ на корилагин указывает на гибель ОК по механизму апоптоза [30]. В комбинации с хемотерапевтическими противоопухолевыми препаратами, корилагин обнаруживает аддитивный эффект [7].

Гераниин «Geraniin» отличается от корилагина только дегидрогексагидроксидифеноильной (DHHDP) группой и гидролизуется до корилагина, эллаговой и галловой кислот. Гераниин не транспортируется через плазматическую мембрану Caco-2 клеток пассивной диффузией. Гексагидроксидифеноильная и DHHDP группы способны ограничивать поступление гераниина в клетки [18,32]. Гераниин способен связываться с гликопротеинами плазматической мембраны, ассоциированными с контрактильными внутриклеточными белками, повышать вязкость фосфолипидного бислоя, ограничивать мобильность белков в латеральной плоскости мембраны, стимулировать сборку белков цитоскелета, спрединг, пиноцитоз, стимулировать увеличение размера митохондрий и количества лизосом, содержащих кислую фосфатазу [33]. Гераниин-опосредованный апоптоз клеток меланомы A2058 вовлекает CD95, каспазу-3, вызывающей деградацию киназы фокальной адгезии (FAK), необходимой для поддержания жизнеспособности клеток. Гераниин, как и корилагин, подавляет экспрессию Bcl-2 в A2058 клетках, вызывает высвобождение цитохрома «C» митохондрий, который и активирует каспазы-9 и -3 [21]. Гераниин стимулирует фосфорилирование p38MAPK→Bcl-2 в MCF-7 клетках, вызывая протеосома-опосредованную деградацию Bcl-2 [34]. Гераниин может рассматриваться как прооксидант (индуцирует АФК) и антиоксидант, аналогично фитокомпоненту ресвератролу. Гераниин, пуникалагин, хебулиновая и хебуловая кислоты не образуют гомодимеров или аддуктов эллаготаннинов после экспозиции к радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу и, в связи с этим, гераниин рассматривается как безопасный и эффективный ингибитор ферроптоза, одной из форм некроза клеток [32].

Хебулиновая кислота «Chebulinic acid» структурно сходна с гераниином, но отличается хебулоильной группой. Она стимулирует активность каспазы-3 и подавляет фосфорилирование и активацию PI3K/AKT и MAPK/ERK киназ, участвующих в пролиферации клеток [9]. Хебулиновая кислота и пуникалагин наиболее эффективны в нейтрализации АФК в сравнении с хебуловой и галловой кислотами [35]. Хебулиновая кислота не стимулирует экспрессию коннексина 43 у клеток HeLa [24]. **Теллимаграндины I** и **II** «Tellimagrandin» являются антиоксидантами вследствие структурной организации и способности стимулировать экспрессию клетками антиоксидантных белков, таких как восстановленная форма глутатиона [24,36]. Теллимаграндин I эффективнее других эллаготаннинов > праекоксин «B» > педункулагин подавляет до 70% активность Ser/Thr протеин фосфатаз (PP1, PP2A) в лизатах клеток HeLa [37], а также пролиферацию клеток HeLa на G_0/G_1 и G_2/M фазах, обнаруживая способность белков-энзимов узнавать структуру эллаготаннинов. Дополнительная галлоильная группа теллимаграндина II

усиливает его цитотоксическое действие на клетки плоскоклеточной карциномы HSC-2 и ОК слюнных желез HSG в сравнении с теллимаграндином I *in vitro* [38].

Казуариктин «Casuarictin» структурно аналогичен педункулагину. Казуариктин и казуаринин (*C*-гл.) независимо от конфигурации остатка глюкозы кора эффективнее, чем теллимаграндин II > педункулагин подавляют антиген-индуцированную дегрануляцию клеток базофильной лейкемии RBL-2H3 крыс (высвобождение β-гексозаминидазы) [39]. **Педункулагин** «Pedunculagin» структурно аналогичен казуариктину [8], стриктинину и изостриктинину [16]. Сходства в структуре педункулагина и стриктинина объясняют их практически идентичное цитотоксическое действие на клетки HeLa и карциномы печени HepG2 [12,13]. Педункулагин, как и теллимаграндины I и II является антиоксидантом как химически и биологически активное соединение, стимулирующее клетки к экспрессии антиоксидантных белков, таких как супероксиддисмутаза [36]. Он вызывает образование «holes-like» структур в плазматической мембране ОК и повышает их проницаемость. Этот эффект педункулагина усиливает действие противоопухолевых препаратов и снижает их эффективную дозу. Педункулагин при ≥ 63,7 μM индуцирует изменения в морфологии клеток и их гибель (18 ч), тогда как при < 12,8 μM клетки сохраняют жизнеспособность вплоть до 72 ч. У неопухолевых фибробластов HEB педункулагин не вызывает изменений в морфологии клеток, указывая на действие специфичное для ОК [12]. Педункулагин не стимулирует клетки HaCaT к высвобождению эластазы, но блокирует ее активность *in vitro* [40], а также эффективно подавляет связывание лиганда с β-адренорецептором, чем с опиоидным и α_2-адренорецепторами [20], указывая на способность эллаготаннинов влиять на активацию GPCR.

Глюкуронид диметилэллаговой кислоты, продукт метилирования эллаговой кислоты внутриклеточным энзимом фазы II – катехол-*O*-метилтрансферазой обнаруживается в лизатах Caco-2 клеток, инкубированных с **пуникалагином** «punicalagin», указывая на внутриклеточный метаболизм эллаготаннина. У малочувствительных к цитотоксическому действию корилагина и гераниина Caco-2 клеток пуникалагин активирует каспазу-3 и индуцирует апоптоз [41]. Пуникалагин аналогично гераниину подавляет экспрессию Bcl-2 и стимулирует экспрессию проапоптозного белка Bax клетками HeLa, ингибируя клеточный цикл в G_1 фазе [42]. Экспозиция клеток глиомы U87MG к пуникалагину вызывает активацию каспаз-9 и -3, подавляет экспрессию цитоплазматических белков циклинов «A» и «B» и повышает экспрессию циклина «E», ингибируя клеточный цикл в G_2/S фазе [43]. **Стриктинин** «Strictinin» конкурентно 1:1 связывается с онкофетальным антигеном ROR1 – рецептором 1 клеток карциномы молочной железы

MDA-MB-231, антагонизируя связывание с плейотропным фактором роста Wnt-5a, что подавляет фосфорилирование PI3K и активацию AKT киназ, вызывая апоптоз «triple negative» MDA-MB-231 клеток, не экспрессирующих рецепторов к эстрогену, прогестерону и EGFR [17].

Касталагин «Castalagin» и **Вескалагин** «Vescalagin» это *C*-гликозидные (*C*-гл.) эллаготаннины, являющиеся стереоизомерными эпимерами по ориентации ОН-группы при С-1 атоме ациклического остатка глюкозы кора (α- и β-аномер) [16]. Нонагидрокситрифеноильная группа (NHTP) затрудняет метаболизм вескалагина и касталагина в организме человека [44]. Несмотря на максимальную структурную идентичность касталагин не поступает в клетки посредством пассивной диффузии в отличие от вескалагина, который в клетках связывается с F-актином. Касталагин эффективно подавляет аутофосфорилирование EGFR клеток аденокарциномы прямой кишки HT29 [45]. Аналог касталагина – 1-*O*-галлоил-касталагин индуцирует изменение морфологии лейкемических клеток HL-60, свидетельствующих об апоптозе и подавляет клеточный цикл в G_2/M фазе [46]. **Грандинин** «Grandinin» (*C*-гл.) отличается от касталагина и вескалагина гликозилированием ликсозой положения С-1 глюкозы кора [47]. Аналогично касталагину грандинин подавляет аутофосфорилирование EGFR у клеток HT29 и пассивно не диффундирует в клетки [45]. Показана специфическая активация GPCR-сопряженных вкусовых рецепторов TAS2R7 вескалагином, касталагином и грандинином, тогда как TAS2R7 и TAS2R5 пуникалагином. Аффинность к TAS2R7 HEK293T клеток снижается в последовательности: грандинин > пуникалагин > касталагин > вескалагин [48].

Казуаринин «Casuarinin» (*C*-гл.) и **Стахиурин** «Stachyurin» (*C*-гл.) – стереоизомерные эпимеры (α и β) с максимальной структурной аналогией к **гиппофаину «B»** «hippophaenin» (*C*-гл.). **Птерокаринин «A»** «pterocarinin A» (*C*-гл.) – ликсозидный аналог стахиурина. Вескалагин отличается от стахиурина NHTP группой. Казуаринин индуцирует экспрессию CD95 [16,49] и подавляет активацию ERK/p38MAPK, фактора транскрипции NF-κB и продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1), индуцированных TNF-α у иммортализированных неопухолевых клеток HaCaT [5]. Казуаринин вызывает изменения морфологии клеток HL-60, наблюдаемым при гибели клеток по механизму апоптоза и ингибирует клеточный цикл в G_2/M фазе, тогда как у MCF-7 клеток и клеток аденокарциномы легких A549 в G_0/G_1 фазе [38,46,49]. **Валоневый** «Valonea» эллаготаннин *in vitro* неспецифически, но эффективно и конкурентно связывается с активным Cu^{2+}–содержащим сайтом металлофермента тирозиназы (оксидоредуктазы) и ингибирует ее активность посредством антиоксидантных свойств и прецепитации катиона меди [50].

Заключение. Антипролиферативное действие мономерных эллаготаннинов на опухолевые клетки *in vitro* обусловлено нарушением гомеостаза клеток, посредством блокирования эллаготаннинами связывания факторов роста с рецепторами, ингибирования функции энзимов «редокс-системы» и индукции экспрессии DR рецепторов (CD95). Выраженная чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическому действию мономерных эллаготаннинов по сравнению с их неопухолевыми аналогами позволяет сделать заключение о целесообразности использования мономерных эллаготаннинов при разработки новых противоопухолевых лекарственных препаратов. Работа выполнена согласно темам НИР FGUU-2025-0001 и FGUU-2025-0005.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершова ИБ. Эффективность гипорамина (эребра) в лечении и профилактике вирусных заболеваний у детей. *Здоровье ребенка*. 2014;8(59):55-58.
2. Джавахян МА, Сокольская ТА, Быков ВА, Семкина ОА, Охотникова ВФ, Крепкова ЛВ, Бортникова ВВ, и др. Фармацевтическая композиция противовирусного действия. 2015. Патент RU 2538082C2.
3. Kim YS, Chung HS, Sang GN, Lee B, Chung HY, Choi JG. Geraniin inhibits the entry of SARS-CoV-2 by blocing the interaction between Spike protein RBD and human ACE2 receptor. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(16):8604.
4. Feldman KS, Sambandam A, Lemon ST, Nicewonger RB, Long GS, Battaglia DF, Ensel SM, Laci MA. Binding affinities of gallotannin analogs with bovine serum albumin: Ramifications for polyphenol-protein molecular recognition. *Phytochemistry*. 1999;51(7):867-872.
5. Kwon DJ, Bae YS, Ju SM, Goh AR, Choi SY, Park J. Casuarinin suppresses TNF-α-induced ICAM-1 expression via blockade of NF-κB activation in HaCaT cells. *BBRC*. 2011;409(4):780-785.
6. Ble-Gonzalez EA, Gomez-Eivera A, Zamilpa A, Lopez-Rodriguez R, Lobato-Garcia CE, Alvarez-Fitz P., Gutierrez-Roman AS, *et al*. Ellagitannin, phenols, and flavonoids as antibacterials from *Acalypha arvensis* (Euphorbiaceae). *Plants* (Basel). 2022;11(3):300.
7. Jia L, Zhou J, Zhao H, Jin H, Lv M, Zhao N, Zheng Z, Lu Y, Ming Y, Yu Y. Corilagin sensitizes epithelial ovarian cancer to chemotherapy by inhibiting Snail-glycolysis pathways. *Oncol. Rep*. 2017;38(4):2464-2470.
8. Berdowska I, Zieliński B, Saczko J, Sopel M, Gamian A, Fecka I. Modulatory impact of selected ellagitannins on the viability of human breast cancer cells. *J. Funct. Foods*. 2018;42:122-128.
9. Wang M, Li Y, Hu X. Chebulinic acid derived from triphala is a promising antitumour agent in human colorectal carcinoma cell lines. *BMC Complement. Altern. Med*. 2018;18(1):342.
10. Fedotcheva TA, Sheichenko OP, Fedotcheva NI. New properties and mitochondrial targets of polyphenol agrimoniin as a natural anticancer and preventive agent. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):2089.

11. Шейченко ОП, Толкачёв ОН, Шейченко ВИ, Шипулина ЛД, Вичканова СА, Быков ВА. Способ получения противовоспалительного препарата гипорамин (варианты). 2003. Патент № RU2197978C1.
12. Xiao SY, Wen BQ, Zhuang HY, Wang JL, Tang J, Chen HZ. Extraction and antitumor activity of pedunculagin from eucalyptus leaves. *ICBEB*. 2012;2012:280-282.
13. Orejola J, Luz MA, Matsuo Y, Saito Y, Morita K, Tanaka T. Characterization and cytotoxicity of ellagitannins from *Stachyurus praecox* fruit. *Tetrahedron*. 2019;75(30):4042-4052.
14. Orabi MAA, Orabi EA, Al Awadh AA, Alshahrani MM, A Abdel-Wahab B, Sakagami H, Hatano T. New megastigmane and polyphenolic components of Henna leaves and their tumor-specific cytotoxicity on human oral squamous carcinoma cell lines. *Antioxidants* (Basel). 2023;12(11):1951.
15. Кабанов ДС, Рубцова ТА, Балеев ДН. Влияние гидролизуемых таннинов из листьев *Hippophae rhamnoides* L. на метаболическую активность кератиноцитов человека (HaCaT). Сборник материалов «Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов». Москва (ВИЛАР). 2023;С.349-357.
16. Suvanto J, Tähtinen P, Valkamaa S, Engström MT, Karonen M, Salminen JP. Variability in Foliar ellagitannins of *Hippophae rhamnoides* L. and identification of a new ellagitannin, Hippophaenin C. *J. Agric. Food Chem*. 2017;66(3):613-620.
17. Fultang N, Illendula A, Chen B., Wu Ch, Jonnalagadda S, Baird N, Klase Z, Peethambaran B. Strictinin, a novel ROR1-inhibitor, represses triple negative breast cancer survival and migration via modulation of PI3K/AKT/GSK3β activity. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217789.
18. Banc R, Rusu ME, Filip L, Popa DS. The impact of ellagitannins and their metabolites through gut microbiome on the gut health and brain wellness within the gut-brain axis. *Foods*. 2023;12(2):270.
19. Senobari Z, Karimi G, Jamialahmadi K. Ellagitannins, promising pharmaceutical agents for the treatment of cancer steam cells. *Phytother. Res*. 2022;36(1):231-242.
20. Zhu M, Phillipson JD, Greengrass PM, Bowery NE, Cai Y. Plant polyphenols: Biologically active compounds or non-selective binders to proteins? *Phytochemistry*. 1997;44(3):441-447.
21. Lee JCh, Tsai ChY, Kao JY, Kao MCh, Tsai SCh, Chang ChS, *et al*. Geraniin-mediated apoptosis by cleavage of focal adhesion kinase through up-regulation of Fas ligand expression in human melanoma cells. *Mol. Nutr. Food Res*. 2008;52(6):655-663.
22. Wang R, Zhu W, Peng J, Li K, Li Ch. Lipid rafts as potential mechanistic targets underluing the pleiotropic actions of polyphenols. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr*. 2022;62(2):311-324.
23. Mollinedo F., Gajate C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic review series: Biology of lipid rafts. *J. Lipid Res*. 2020;61(5):611-635.
24. Yi ZCh, Liu YZ, Li HX, Yin Y, Zhuang FY, Fan YB, Wang Z. Tellimagrandin I enhances gap junctional communication and attenuates the tumor phenotype of human cervical carcinoma HeLa cells *in vitro*. *Cancer Lett*. 2006;242(1):77-87.

25. Lystad AH, Simonsen A. Phosphoinositide-binding proteins in autophagy. *FEBS Lett*. 2016;590(15):2454-2468.
26. Wang W, Lv J, Wang L, Wang X, Ye L. The impact of heterogeneity in phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer and possible therapeutic treatments. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2017;64:116-124.
27. Gupta A., Singh A.K., Kumar R., Ganguly R., Rana H.R., Pandey P.K, *et al*. Corilagin in Cancer: A critical evaluation of anticancer activities and molecular mechanisms. *Molecules*. 2019;24(18):3399.
28. Matsuo Y, Iki M, Okubo Ch, Saito Y, Tanaka N. Conformationally flexible ellagitannins: Conformational analysis of davidiin and punicafolin via DFT calculation of 1H NMR coupling constants. ChemRxiv. 2022. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-wrlxz-v2.
29. Jia L, Jin H, Zhou J, Chen L, Lu Y, Ming Y, Yu Y. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF-β signaling pathways. *BMC Complement Altern. Med*. 2013;13:33.
30. Xu J, Zhang G, Tong Y, Yuan J, Li Y, Song G. Corilagin induces apoptosis, autophagy and ROS generation in gastric cancer cells *in vitro*. *Int. J. Mol. Med*. 2019;43(2):967-979.
31. Ming Y, Zheng Z, Chen L, Zheng G, Liu S, Yu Y, Tong Q. Corilagin inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing G2/M phase arrest. *Cell Biol. Int*. 2013;37(10):1046-1054.
32. Chen B, Li X, Liu J, Li Y, Dai W, Chen Y, Chen D. Ferroptosis-inhibitory effect and possible mechanisms of ellagitannin geraniin. *ChemistryOpen*. 2021;10(8):737-739.
33. Ushio H, Okuda T, Abe H. Effects of geraniin on morphology and function of macrophages. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1991;96(3), 224-230.
34. Zhai JW, Gao Ch, Ma WD, Wang W, Yao LP, Xia XX, *et al*. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. *Toxicol. Mech. Methods*. 2016;26(5):311-318.
35. Manosroi A, Jantrawut P, Akazawa H, Akihisa T, Manosroi J. Biological activities of phenolic compounds isolated from galls of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae). *Nat. Prod. Res*. 2010;24(20):1915-1926.
36. Al-Sayed E, Esmat A. Hepatoprotective and antioxidant effect of ellagitannins and galloyl esters isolated from *Melaleuca styphelioides* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Pharm. Biol.* 2016;54(9):1727-1735.
37. Kónya Z, Bécsi B, Kiss A, Horváth D, Raics M, Kövér KE, *et al*. Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A by ellagitannins: structure-inhibitory potency relationships and influences on cellular systems. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2019;34(1):500-509.
38. Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, *et al*. Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines - A possible mechanism. *Phytomedicine*. 2000;7(1):39-47.
39. Yamada P, Ono T, Shigemori H, Han J, Isoda H. Inhibitory effect of tannins from galls of *Carpinus tschonoskii* on the degranulation of RBL-2H3 cells. *Cytotechnology*. 2012;64(3):349-356.

40. Hrenn A, Steinbrecher T, Labahn A, Schwager J, Schempp CM, Merfort I. Plant phenolics inhibit neutrophil elastase. *Planta Med*. 2006;72(12):1127-1131.
41. Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM. *In vitro* studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J. Agric. Food Chem*. 2007;55(4):1491-1500.
42. Tang J., Li B., Hong S., Liu Ch., Min J., Hu M, *et al*. Punicalagin suppresses the proliferation and invasion of cervical cancer cells through inhibition of the β-catenin pathway. *Mol. Med. Rep*. 2017;16(2):1439-1444.
43. Wang SG, Huang MH, Li JH, Lai FI, Lee HM, Hsu YN. Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells. *Acta Pharmacol. Sin*. 2013;34(11):1411-1419.
44. Dobreva MA, Green RJ, Mueller-Harvey I, Salminen JP, Howlin BJ, Frazier RA. Size and molecular flexibility affect the binding of ellagitannins to bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem*. 2014;62(37):9186-9194.
45. Fridrich D, Glabasnia A, Fritz J, Esselen M, Pahlke G, Hofmann T, Marko D. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem*. 2008;56(9):3010-3015.
46. Yang LL, Lee CY, Yen KY. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett*. 2000;157(1):65-75.
47. De Freitas V, Mateus N. Protein/Polyphenol interaction: Past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Curr. Org. Chem*. 2012;16(6):724-746.
48. Soares S, Brandão E, Guerreiro C, Soares S, Mateus N, De Freitas V. Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. *Molecules*. 2020;25(11):2590.
49. Kuo PL, Hsu YL, Lin TC, Lin LT, Chang JK, Lin CC. Casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Planta Med*. 2005;71(3):237-243.
50. Liu J, Liu Y, He X, Teng B, McRae JM. Valonea tannin: Tyrosinase inhibition activity, structural elucidation and insights into the inhibition mechanism. *Molecules*. 2021;26(9):2747.

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ-САМЦОВ НА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВАЦИЮ АСТРОЦИТОВ КОРЫ МОЗГА

Куртова Е.Е.[1], Абдыева А.А.[1], Себенцова Е.А.[2], Симоненко С.Д.[3], Горбачева Л.Р.[1,3]

[1]ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет), Москва, Россия
[2]НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия
[3]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Гипоксия плода или новорожденного является одной из основных причин поражения мозга и неонатальной смертности. Нарушение мозговых функций и развитие патологии мозга в результате перинатальной гипоксии сопряжено, как и нейродегенеративные процессы, с нейровоспалением. Однако, как однократная гипоксия влияет на провоспалительный статус одних из основных клеток мозга астроциты до конца не ясно.

Поэтому цель представленной работы было выявить особенности провоспалительной активации астроцитов у новорожденных крысят-самцов, перенесших однократное воздействие гипоксии.

В ходе исследования новорожденных самцов крыс линии Вистар подвергали гипоксии (2 ч при 8% кислорода). Через сутки из коры мозга животных выделяли первичную культуру астроцитов. Провоспалительную активацию астроцитов осуществляли аппликацией липополисахарида (ЛПС, 100 и 1000 нг/мл) и тромбина (10, 50 и 100 нМ). Выживаемость/пролиферацию клеток оценивали с помощью МТТ-теста, а уровень провоспалительной активации по высвобождению NO и IL-6, с помощью реактива Грисса и ИФА, соответственно. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1.

В ходе работы установлено, что однократная гипоксия существенно повышает пролиферацию астроцитов (рис. 1). В тоже время ЛПС в обоих используемых концентрациях снижал пролиферацию астроцитов в контрольной группе (рис. 2). При этом, в культуре астроцитов, выделенных из животных, подвергавшихся гипоксии, эндотоксин только в концентрации 100 нг/мл приводил к снижению числа клеток, в то время как 1 мкг/мл ЛПС не изменял данный показатель (рис. 2).

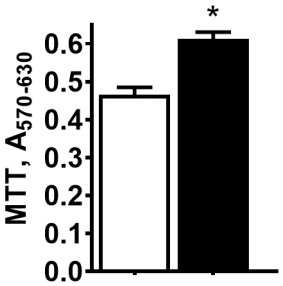


Рис. 1. Влияние однократной нормобарической гипоксии на пролиферацию астроцитов. (белый цвет – нормоксия, черный – гипоксия, * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе «нормоксия»).

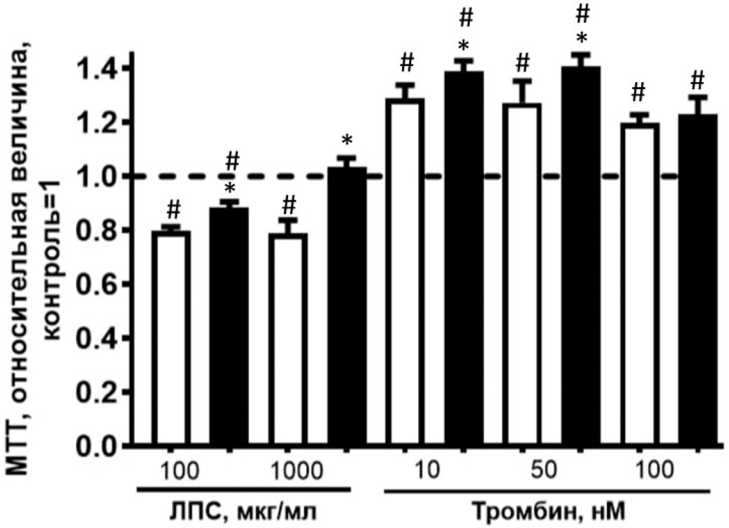


Рис. 2. Влияние однократной нормобарической гипоксии на липополисахарид (ЛПС) и тромбин-вызванную пролиферацию астроцитов. (белый цвет – нормоксия, черный – гипоксия, * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе «нормоксия», # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе «контроль» (без ЛПС или тромбина, соответственно)).

Влияние тромбина на первичную культуру астроцитов, обнаруженное в представленной работе, согласуется с полученными ранее нами и другими исследователями данными, которые указывают на зависимость действия протеазы от её концентрации. Так, нами продемонстрировано, что тромбин повышает пролиферацию астроцитов в 1,4 раза в концентрациях 10 и 50 нМ и в 1,2 раза в концентрации 100 нМ (рис. 2), что может свидетельствовать о том, что тромбин в высокой концентрации оказывает токсическое действие. Необходимо отметить, что гипоксия хотя и не изменяла направление эффекта тромбина на пролиферацию астроцитов, но достоверно повышала уровень пролиферации клеток на фоне действия тромбина в концентрациях 10 и 50 нМ, но не 100 нМ (рис. 2).

Интересно, что используемые нами в работе концентрации протеазы не влияли на секрецию NO астроцитами во всех исследуемых группах. В тоже время ЛПС дозозависимо повышал секрецию NO астроцитами: в 4 и в 5 раз в условиях нормоксии и в 2,5 и в 4 раза при гипоксии для 100 и 1000 нг/мл ЛПС, соответственно (рис. 3).

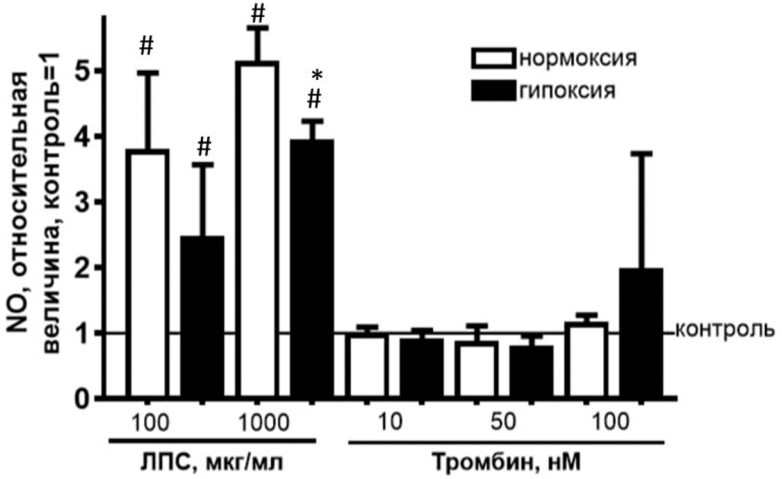


Рис. 3. Влияние однократной нормобарической гипоксии на липополисахарид (ЛПС)-и тромбин-вызванную секрецию NO астроцитами. (* – $p \leq 0,05$ по отношению к группе «нормоксия», # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе «контроль» (без ЛПС)).

Таким образом, мы наблюдали снижение провоспалительной секреции астроцитов под действием эндотоксина после однократного воздействия гипоксии. Известно, что гипоксия потенцирует пролиферацию астроцитов как в *in vivo*, так и *in vitro* экспериментах [1,2] так показано, что этот процесс опосредуется через Notch-1 сигналинг [1]. Настоящее исследование подтверждает данный факт и указывает на сохранение этого эффекта гипоксии на пролиферацию и после выделения астроцитов из мозга в период их культивирования *in vitro*. Тесная связь гипоксии и воспаления показана в целом ряде работ, посвященных разным органам и тканям, и продемонстрировано, что эта взаимодействие обеспечивается сопряжением HIF-1 и NF-κB молекулярных путей [3]. Вместе с тем, известно, что ЛПС-зависимая провоспалительная активация опосредуется через NF-κB [4], однако, какое действие на этот механизм в астроцитах будет оказывать однократная нормобаричекая гипоксия не ясно. Нами продемонстрировано изменение провоспалительной активации астроцитов после in vivo воздействия гипоксии. В отличие от эффекта ЛПС на пролиферацию астроцитов, гипоксия привела к снижению ЛПС-вызванной секреции NO, что может свидетельствовать о разных механизмах TLR4-зависимой регуляции пролиферации и активации iNOS.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что нормобарическая однократная гипоксия новорожденных крыс-самцов сопровождается существенным изменением эндотоксин-вызванной провоспалительной активации астроцитов мозга, что может быть одним из механизмов изменения мозговых функций у новорожденных с перинатальной гипоксией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang, Y.; He, K.; Wang, F.; Li, X.; Liu, D. Notch-1 Signaling Regulates Astrocytic Proliferation and Activation after Hypoxia Exposure. Neurosci Lett 2015, 603, 12-18, doi:10.1016/J.NEULET.2015.07.009.
2. Tregub, P.P.; Morgun, A. V.; Osipova, E.D.; Kulikov, V.P.; Malinovskaya, N.A.; Kuzovkov, D.A. Hypercapnia and Hypoxia Stimulate Proliferation of Astrocytes and Neurons In Vitro. Bull Exp Biol Med 2020, 169, doi:10.1007/s10517-020-04972-w.
3. Krzywinska, E.; Stockmann, C. Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. Biomedicines 2018, 6.
4. Zhao, J.; Bi, W.; Xiao, S.; Lan, X.; Cheng, X.; Zhang, J.; Lu, D.; Wei, W.; Wang, Y.; Li, H.; et al. Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide Causes Cognitive Impairment in Mice. Sci Rep 2019, 9, doi:10.1038/s41598-019-42286-8.

СТАКСАНТИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ AC16, ВЫЗВАННУЮ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Ломовская Я.В., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) находятся на одном из первых мест по распространенности и в настоящее время являются одной из главных причин смерти и инвалидности населения многих развитых стран [1]. Несмотря на непрерывное развитие науки и внедрение новых медицинских технологий, позволяющих проводить раннюю диагностику, значительного снижения смертности от ССЗ, как в России, так и во всем мире достичь не удается. В связи с этим актуальным остается поиск новых природных антиоксидантов, предотвращающих или ослабляющих повреждения клеток сердца. В настоящее время, для повышение защитной реакции организма и для снижения стресс- и возраст-зависимых окислительных повреждений, всё больше внимания уделяется исследованиям, направленным на предотвращение митохондриальной дисфункции при помощи различных антиоксидантов, среди которых наиболее эффективным является астаксантин (АСТ) [2]. В результате воздействия на клетку различных препаратов, функционирование митохондрий в клетке может улучшаться, увеличивая при этом количество здоровых митохондрий, что может быть многообещающим подходом для устранения различных патологических состояний. Ранее, было показано, что АСТ улучшал функциональное состояние митохондрий сердца у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной изопротеренолом. Введение АСТ предотвращало снижение дыхательного контроля митохондрий, вызванное изопротеренолом. Кроме того, АСТ повышал Ca^{2+} ёмкость и снижал скорость набухания митохондрий, что замедляло открытие поры неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, мPTP), т.е. снижало проницаемость митохондриальной мембраны [3-5]. Более того, было показано, что АСТ повышал жизнеспособность кардиомиоцитов линии H9c2 в присутствии индукторов цитотоксичности, таких как пероксид водорода (H_2O_2) и доксорубицин (Докс) в кардиомиоцитах крысы линии H9c2. Это сопровождалось повышением митохондриального мембранного потенциала и снижением продукции АФК несмотря на

присутствие в клетках H_2O_2 [6, 7]. В настоящей работе, мы исследовали влияние АСТ на жизнеспособность и пролиферативную активность при H_2O_2-индуцированнолй цитотоксичности в кардиомиоцитах человека AC16. Кардиомиоциты стимулировали H_2O_2 для создания модели повреждения клеток миокарда. Более того, было исследовано изменения содержания белков, таких как протеинкиназа R-подобная киназа эндоплазматического ретикулума (PERK) и белков семейства Bcl (BAX, Bcl_{XL}, Bcl_W) в наших экспериментальных условиях.

Результаты. Сначала был исследован эффект АСТ, H_2O_2 и Докс на жизнеспособность клеток кардиомиоцитов AC16 (Рис. 1). Для этого клетки в количестве $2{,}5\times10^3$ клеток на лунку высаживались в 96-луночный культуральный планшет и инкубировались в течение 24 ч с добавлением различных концентраций АСТ от 0 до 100 мкМ (А) и H_2O_2 от 0 до 400 мкМ (Б). Количество живых клеток после инкубации с АТ и H2O2 оценивали по интенсивности восстановления резазурина (30 мкг/мл, 4 ч в условиях CO_2 – инкубатора). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшетного спектрофлюориметра Infinite F200 (Tecan, Grodig, Австрия) (Lavogina и др., 2022) при длине волн возбуждения и эмиссии 560 нм и 590 нм, соответственно. Как видно из рисунка, АСТ в концентрации до 55 мкМ не оказывал влияния на жизнеспособность клеток и количество живых клеток не изменялось по сравнению с контролем, однако при 100 мкМ выживаемость клеток снижалась на 38% что указывает на то, что токсичность АСТ проявляется при более высоких концентрациях. При выявлении оптимальной концентрации H_2O_2 было показано, что добавление 5 мкМ H_2O_2 количество живых клеток снижалось на 13,3%, а при увеличении концентрации H_2O_2 с 14 до 133 мкМ, их количество снижалось на 24,2 и 83,3%, соответственно.

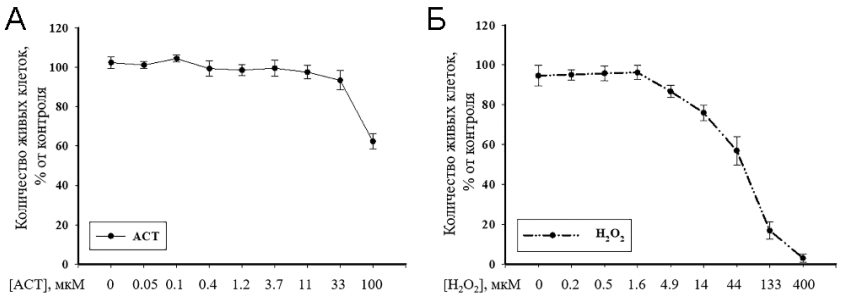


Рис. 1. Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов АСТ и H_2O_2 в кардиомиоцитах AC16. Клетки обрабатывали указанными концентрациями АСТ (А) и H_2O_2 (Б) в течение 24 часов. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) из десяти отдельных экспериментов.

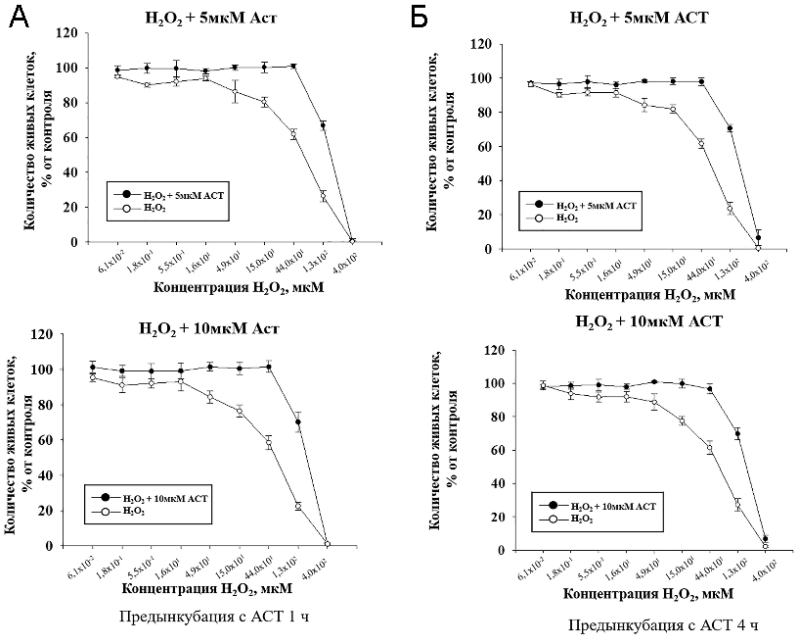


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности кардиомиоцитов AC16 от концентрации АСТ и H_2O_2 и от времени инкубации с АСТ. Инкубация клеток с АСТ (5 и 10 мкМ) производилась в течение 1 (А), 4 (Б). Количество живых клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего ± S.D. из шести отдельных экспериментов.

Поскольку жизнеспособность клеток зависела не только от концентрации применяемых препаратов, но и от времени инкубации клеток с АСТ, то на следующем этапе оценивали совместное влияние различных концентраций АСТ и H_2O_2 на выживаемость кардиомиоцитов AC16 (Рис. 2). С этой целью, клетки предварительно инкубировали с АСТ в концентрациях 5 и 10 мкМ в течение 1 и 4 часов, после чего их обрабатывали H_2O_2 в концентрациях от 0,06 до 400 мкМ в течение суток. Из рисунка 2 видно, что H_2O_2 в концентрациях до 4,9 мкМ проявлял низкую цитотоксичность, вызывая гибель не более 10% клеток. Однако с увеличением концентрации H_2O_2 его цитотоксичность значительно повышалась, достигая полной гибели клеток при концентрации 400 мкМ, по сравнению с контролем. Предварительная инкубация AC16 в течение 1 и 4 часов с АСТ в концентрациях 5 и 10 мкМ способствовала сохранению жизнеспособности всей популяции клеток при воздействии H_2O_2 в концентрациях до 44 мкМ.

Предварительная обработка клеток с АСТ значительно повышала их устойчивость к действию H_2O_2. Следует отметить, что предварительная инкубация клеток с АСТ при воздействии H_2O_2 в концентрации 130 мкМ позволяет сохранить жизнеспособность клеток на уровне 70%, тогда как без предварительной обработки АСТ жизнеспособность клеток снижалась до 20% при той же концентрации H_2O_2. На основании полученных результатов, в последующих исследованиях для 1- и 4-часовой инкубации клеток с АСТ были выбраны концентрации АТ равные 5 и 10 мкМ с последующим добавлением 100 мкМ H_2O_2.

Далее мы исследовали защитное действие АСТ на изменение пролиферативной активности кардиомиоцитов линии AC16 при пероксид водорода-индуцированной клеточной гибели.

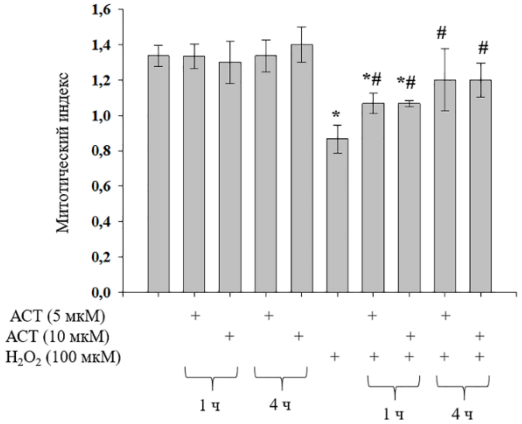


Рис. 3. Влияние АСТ совместно с H_2O_2 на митотическую активность клеток AC16. Количество живых клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принималось за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение шести отдельных экспериментов. *p <0,05 значимое изменение по сравнению с контролем; #p <0,05 значимое изменение по сравнению со значением H_2O_2.

Для оценки пролиферации клеток использовали метод расчета индекса митотической активности (МИ), который позволяет количественно определить способность клеток к делению. МИ оценивали с помощью окрашивания клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (1 мкг/мл, 25 мин). Количество митотических клеток подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000. МИ определяли по формуле (P + M + A + T)/N, где P + M + A + T – сумма всех клеток в фазах: профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно, N – общее

количество клеток (Рис. 3). Как видно из рисунка, МИ в присутствии АСТ в концентрациях 5 и 10 мкМ не отличался от контроля. Добавление к клеткам H_2O_2 приводило к снижению МИ на 34% по сравнению с контролем. Однако предварительная инкубация клеток с 5 и 10 мкМ АСТ в течение часа с последующим добавлением к клеткам 100 мкМ H_2O_2 приводило к повышению МИ на 25%, как при 1-часовой, так и при 4-часовой инкубации с АСТ по сравнению с одиночным действием пероксида водорода. Важно отметить, что предварительная инкубация с АСТ позволяет сохранить МИ на уровне контрольных значений при воздействии H_2O_2. Это свидетельствует о том, что АСТ обладает защитным действием, уменьшая негативное влияние H_2O_2 на клеточное деление.

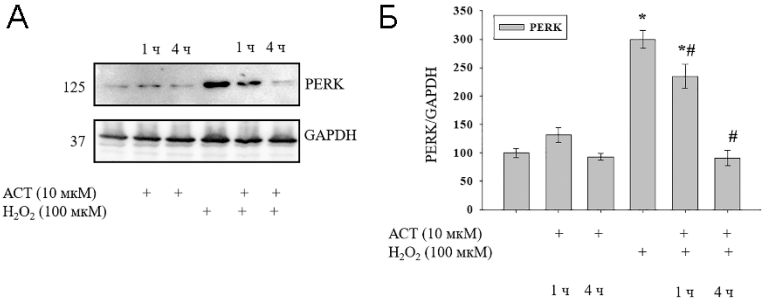


Рис. 4. Влияние АСТ и пероксида водорода на изменение содержания PERK в кардиомиоцитах AC16. А – иммуноокрашивание антителами к PERK, Б – количественная оценка иммуноокрашивания, нормированная по белку GAPDH. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение 6 отдельных экспериментов. *p <0,05 значимое изменение по сравнению с контролем; #p <0,05 значимое изменение по сравнению со значением H_2O_2.

Протеинкиназа R-подобная киназа эндоплазматического ретикулума (PERK) является одной из основных сигнальных молекул, участвующих в регуляции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР) [8]. Поэтому на следующем этапе, было исследовано изменение PERK в наших экспериментальных условиях. На рисунке 4 показан Вестерн блот в присутствии специфических антител к PERK. Диаграмма отражает количественную оценку изменения содержания белка в митохондриях, нормированного по белку GAPDH. Как видно из рисунка в присутствии H_2O_2 содержание PERK повышалось в 3 раза по сравнению с контролем. Предынкубация клеток с АСТ с последующим добавлением пероксида приводило к снижению уровня PERK, особенно при инкубации AC16 с АСТ в течение 4 часов. Поэтому в следующем эксперименте использовали только 4-часовую инкубацию AC16 с АСТ.

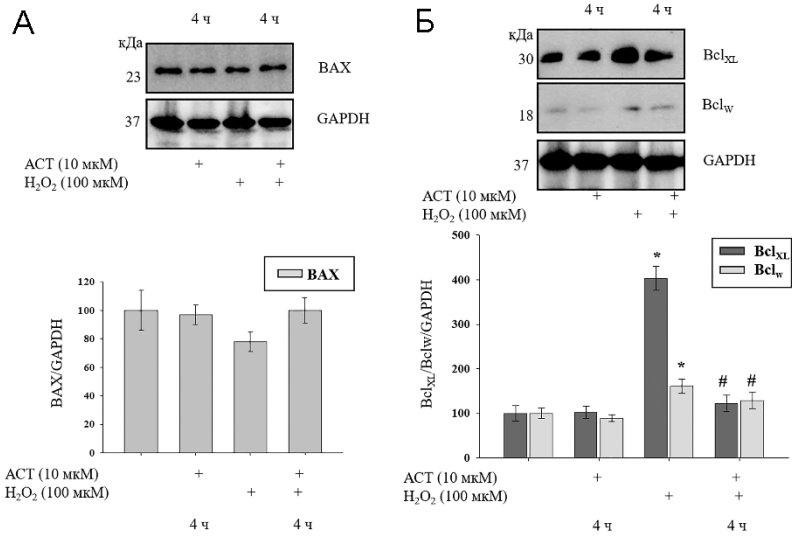


Рис. 5. Влияние АСТ и пероксида водорода на изменение содержания PERK в кардиомиоцитах AC16. А – иммуноокрашивание антителами к BAX, Б - Bcl_{XL}, Bcl_W в нижней части количественная оценка иммуноокрашивания, нормированная по белку GAPDH. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение шести отдельных экспериментов. *p < 0,05 значимое изменение по сравнению с контролем; #p < 0,05 значимое изменение по сравнению со значением H_2O_2.

Далее, было исследовано влияние АСТ и пероксида водорода на изменение содержания белков семейства Bcl-2, таких как BAX, Bcl_{XL} и Bcl_W. На рисунке 5 в верхней части показан Вестерн блот в присутствии специфических антител к BAX, Bcl_{XL} и Bcl_W. В нижней части представлена количественная оценка с помощью компьютерной денситометрии, нормированной по белку GAPDH. Как видно из рисунка, добавление к клеткам H_2O_2 приводило к снижению содержания BAX на 20% по сравнению с контролем, тогда как уровни Bcl_{XL} и Bcl_W повышались в 4 и 1,6 раз, соответственно в этих условиях. При 4-часовой предынкубацией с АСТ с последующим добавлением пероксида водорода содержание белков не отличалось от контроля.

Заключение. В настоящем исследовании было изучено действие астаксантина при повреждении кардиомиоцитов линии AC16 100 мкМ пероксидом водорода. Астаксантин предотвращал снижение жизнеспособности клеток, вызванное пероксидом. Более того, астаксантин снижал негативное влияние пероксида на клеточное деление.

В этих условиях, содержание протеинкиназы R-подобная киназа эндоплазматического ретикулума повышалось до контрольных значений, при этом восстанавливался и баланс BAX, Bcl_{XL} и $Bcl_{W,}$ нарушенный пероксидом водорода. Астаксантин проявляет защитный эффект в кардиомиоцитах AC16.

Работа выполнена в рамках РНФ № 24-25-00129.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cesare MD, Perel P, Taylor S, Kabudula C, Bixby H, Gaziano T, McGhie DV, Mwangi J, Pervan B, Narula J, Pineiro D, Pinto FJ. The Heart of the World. Glob Heart. 2024;19(1): 11.
2. Fassett R., Coombes J. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. Molecules. 2012; 17: 2030–2048.
3. Baburina Y., Krestinin R, Odinokova I, Sotnikova L, Kruglov A, Krestinina O. Astaxanthin Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Rat Heart Mitochondria. Antioxidants (Basel). 2019; 8 (12): 576.
4. Krestinin R, Baburina Y, Odinokova I, Kruglov A, Fadeeva I, Zvyagina A, Sotnikova L, Krestinina O. Isoproterenol-Induced Permeability Transition Pore-Related Dysfunction of Heart Mitochondria Is Attenuated by Astaxanthin. Biomedicines. 2020; 8 (10): 437.
5. Krestinina O, Baburina Y, Krestinin R, Odinokova I, Fadeeva I, Sotnikova L. Astaxanthin Prevents Mitochondrial Impairment Induced by Isoproterenol in Isolated Rat Heart Mitochondria. Antioxidants (Basel). 2020; 9 (3): 262.
6. Krestinin R, Kobyakova M, Baburina Y, Sotnikova L, Krestinina O. Astaxanthin Protects Against H2O2- and Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in H9c2 Rat Myocardial Cells. Life. 2024; 14 (11): 1409.
7. Крестинин Р.Р., Кобякова М.И., Бабурина Ю.Л., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В. Астаксантин снижает кардиотоксичность, вызванную H2O2 и доксорубицином в клетках кардиомиоцитов линии H9c2. Биохимия. 2024; 89 (10): 1731-1743.
8. Liu Z., Lv Y., Zhao N., Guan G., Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. Cell Death & Disease. 2015; 6: 1822

ЭКСПРЕССИЯ CX43 В НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Нвосу Ч.Д., Кириченко Е.Ю., Родькин С.В.

Научно-исследовательская лаборатория «Медицинские цифровые изображения на основе базовой модели», кафедра «Биоинженерия», Факультет «Биоинженерия и ветеринарная медицина», Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – одна из ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире, не имеющая эффективного нейропротекторного лечения. Вторичное повреждение, развивающееся после ЧМТ, включает каскад молекулярных и клеточных изменений, приводящих к нейродегенерации, воспалению и нарушению межклеточной коммуникации [1]. Одним из ключевых белков, регулирующих межклеточные взаимодействия в центральной нервной системе, является коннексин-43 (Cx43) – основной компонент щелевых контактов астроцитов [2].

Роль Cx43 при ЧМТ остается неоднозначной. В остром периоде снижение уровня Cx43 приводит к нарушению межклеточной коммуникации, ухудшению ионного баланса и усилению воспалительного ответа, что способствует гибели нейронов. В поздние сроки наблюдается компенсаторное повышение экспрессии Cx43, которое может играть двойственную роль: с одной стороны, ограничивать зону повреждения и поддерживать гомеостаз, с другой – способствовать формированию глиального рубца, препятствующего регенерации. Дополнительно расщепление Cx43 и высвобождение его фрагментов могут активировать сигнальные пути, связанные с воспалением и апоптозом [3].

Распределение и функции Cx43 после ЧМТ остаются предметом дискуссий. Одни исследования указывают на его нейропротекторную роль, другие – на участие в процессах повреждения. Различия в данных могут быть связаны с особенностями экспериментальных моделей, временными окнами анализа и методами детекции Cx43 [4].

Изучение динамики изменений Cx43 и его фрагментов при ЧМТ имеет важное значение для понимания механизмов вторичного повреждения. Углубленный анализ его регуляции может способствовать разработке новых терапевтических подходов, направленных на модуляцию межклеточных взаимодействий и снижение последствий нейротравмы. Целью работы стало изучение экспрессии Cx43 в ранние сроки при тяжелой ЧМТ.

Материалы и методы. Для моделирования ЧМТ использовался модифицированный протокол. Мышей анестезировали и фиксировали в системе для нанесения травмы. Очаговое повреждение вызывалось сбросом металлического груза (200 г) с высоты 3 см на обнажённый череп. Повреждалась теменная кора правого полушария. Вскрытие выявляло умеренный отёк и некроз в зоне удара.

Иммунофлуоресцентная конфокальная лазерная микроскопия. Для анализа экспрессии и пространственного распределения Cx43, а также его колокализации с нейрональным маркером использовали конфокальную лазерную микроскопию. Окрашивание проводилось с применением первичных антител против Cx43, а также маркером нейронов NeuN.

Пермеабилизацию клеточных мембран осуществляли путем инкубации образцов с 0,1% растворе Triton X-100 в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Для предотвращения неспецифического связывания антител блокировку проводили в 5% растворе сывороточного альбумина в PBS в течение 1 часа.

Далее образцы инкубировали с первичными антителами против Cx43 (1:500) и NeuN (1:1000) в течение 48 часов при 4°C. После промывки в PBS применяли вторичные антитела, инкубируя образцы 24 час при 4°C. Для визуализации ядер всех клеток использовали высокочувствительный флуоресцентный индикатор Sytox Green Stain.

После финального промывания срезы помещали в среду для предотвращения фотовыцветания и накрывали покровным стеклом. Исследование проводилось с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа Abberior Facility Line при использовании многоканальной детекции. Обработку изображений и построение 3D-моделей осуществляли в программе ImageJ.

Для количественного анализа экспрессии Cx43 оценивали процентную плотность иммунопозитивного сигнала на срезах ткани. Процентная плотность определялась как отношение площади, занятой Cx43-позитивными сигналами, к общей площади исследуемой области, выраженное в процентах.

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 ± SEM.

Результаты и их обсуждение. В данном исследовании изучалось влияние ЧМТ на экспрессию Cx43 и состояние нейронов в коре головного мозга мышей с повреждением теменной области правого полушария. Для анализа использовали иммунофлуоресцентную конфокальную микроскопию с нейрональным маркерами NeuN, Cx43 и SYTOX Green в контралатеральной (контрольной) и ипсилатеральной (поврежденной)

зонах. Гистологическое исследование подтвердило наличие выраженного отека и некроза в области травмы.

Окрашивание на NeuN выявило в контрольной группе хорошо дифференцированные нейрональные структуры с четкими округлыми ядрами и равномерной цитоплазмой. В зоне повреждения сигнал NeuN в ядре был значительно снижен, а морфология нейронов изменена, что свидетельствует об их значительном повреждении или гибели и выходе NeuN из ядра в цитоплазматическое пространство. Анализ с использованием SYTOX Green показал равномерное распределение ядер в контроле, тогда как в ипсилатеральной области наблюдалась их значительно уменьшение в размере – ядерное сжатие, а также фрагментация, что указывает на активацию процессов апоптоза [5].

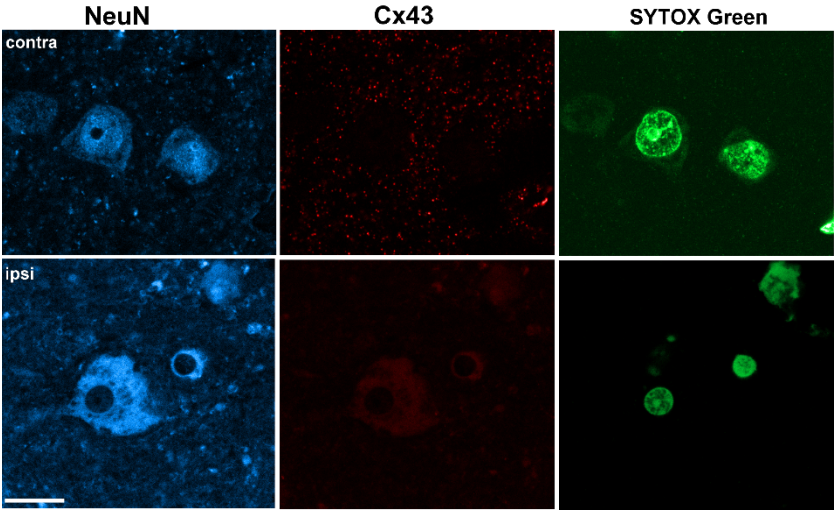


Рис. 1. Иммунофлуоресцентная конфокальная лазерная микроскопия: экспрессия Cx43 в нервной ткани головного мозга в контралатеральном (неповрежденном) и ипсилатеральном (поврежденном) полушарии через 24 часа после тяжелой ЧМТ. Масштаб – 40 мкм.

Экспрессия Cx43, обеспечивающего межклеточную связь, в контрольной зоне представлена равномерно распределенными яркими сигналами. В ипсилатеральной области плотность Cx43 значительно снижалась, что подтверждено количественным анализом: в контроле плотность Cx43 составляла 14%, тогда как в поврежденной зоне снижалась до 2% ($p < 0.001$). Это указывает на значительное нарушение межклеточной коммуникации после ЧМТ.

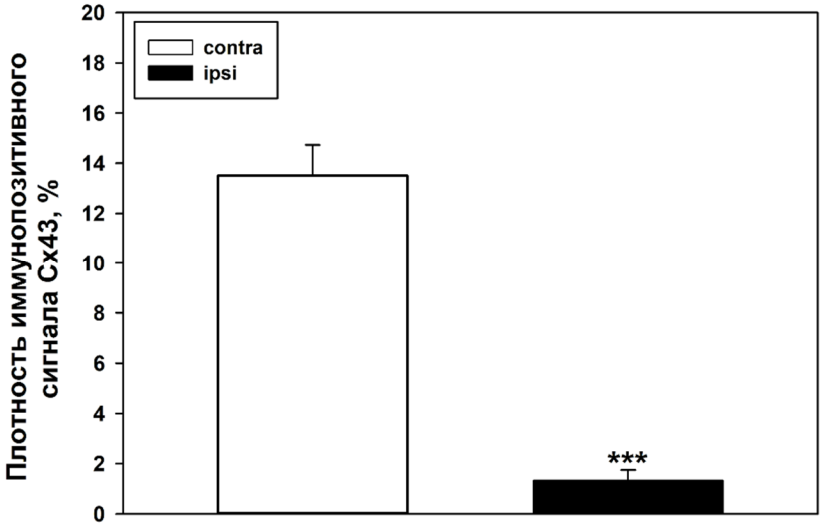


Рис. 2. Плотность иммунопозитивного сигнала Cx43, выраженная в процентах, контралатеральной и ипсилатеральной коре через 24 часа после тяжелой ЧМТ. ***p<0.01 – сравнение контралатеральной *vs.* ипсилатеральной коры одного животного.

Снижение уровня Cx43 может быть связано как с повреждением и гибелью астроцитов, являющихся основным источником данного белка, так и с его деградацией в условиях травмы. Потеря Cx43 приводит к нарушению работы щелевых контактов, что может способствовать усилению воспалительного ответа, снижению устойчивости клеток к стрессу и ухудшению регенерации поврежденной ткани. Кроме того, нарушение межклеточной связи препятствует поддержанию ионного гомеостаза и энергетического обмена, что усугубляет вторичное повреждение мозга [1-4].

Таким образом, проведенный анализ подтверждает, что ЧМТ вызывает значительное снижение уровня Cx43 в поврежденной коре головного мозга (2% против 14% в контроле, $p < 0.001$), а также гибель нейронов и выраженные признаки клеточной деструкции. Полученные данные подчеркивают ключевую роль Cx43 в патогенезе ЧМТ и поддержании межклеточной коммуникации. Дальнейшие исследования, направленные на модуляцию уровня Cx43, могут способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на снижение вторичного повреждения и улучшение функционального восстановления после ЧМТ.

Работа выполнена за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FZNE-2024-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, et al. Traumatic brain injuries. Nat Rev Dis Primers. 2016; 2:16084.
2. Nakase T, Söhl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. Am J Pathol. 2004;164(6):2067-2075.
3. Wiencken-Barger AE, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD. A role for Connexin43 during neurodevelopment. Glia. 2007;55(7):675-686.
4. Chen W, Guo Y, Yang W, et al. Phosphorylation of connexin 43 induced by traumatic brain injury promotes exosome release. J Neurophysiol. 2018; 119(1):305-311.
5. He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y. Autophagy and Apoptosis in Acute Brain Injuries: From Mechanism to Treatment. Antioxid Redox Signal. 2023;38(1-3):234-257.

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ КРЫСЫ

Пшемыский М.А., Гусакова С.В., Гусакова В.С., Смаглий Л.В.

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Введение. Механизмы адаптации клеток кровеносных сосудов к длительному холодовому воздействию остаются во многом неизученными. Показано, что постоянное холодовое воздействие (4°C, 4 недели) повышает устойчивость сердца крыс к ишемии/реперфузии (И/Р), тогда как периодическое – не влияет на толерантность к И/Р [2], но усиливает общую адаптацию к холоду [3]. Этот эффект сохраняется до 14 дней [3]. Однако хронический холод провоцирует артериальную гипертензию и гипертрофию миокарда [1], тогда как периодическое воздействие (4°C, 4 ч/день, 4 нед.) таких эффектов не вызывает [3]. Холодовая гипертензия сохраняется до 30 дней после прекращения воздействия и связана с активацией альдостерона и ангиотензиновых рецепторов [1]. Также холод повышает уровень эндотелина-1 в тканях и усиливает чувствительность сосудов к нему [1]. Данные о воздействии холодовой адаптации на сосудистую систему получены преимущественно на сосудах большого круга кровообращения, в данной работе изучалось влияние холодовой адаптации у крыс на сосуды легочного круга кровообращения [1-3].

Материалы и методы. Исследование проводили тензометрическим методом на сегментах легочной артерии (ЛА) крыс линии Wistar. Для исследования использовали сегменты ЛА интактных крыс и крыс, подвергшихся холодовому воздействию (+2 - +4 оС) в течение 14 и 28 дней. Эндотелий-зависимое расслабление сегментов вызывали ацетилхолином (АЦХ, 0,01-100 мкМ).

Результаты. Холодовое воздействие в течение 28 дней приводит к снижению сократительной активности ЛА, индуцированной гиперкалиевым раствором, и способности сегментов поддерживать механическое напряжение при росте концентрации фенилэфрина. Холодовое воздействие в течение 14 дней снижает АЦХ-зависимое расслабление сегментов легочной артерии, тогда как при 28-дневном холодовом воздействии АЦХ-зависимое расслабление ЛА статистически значимо не отличается от сегментов ЛА контрольной группы крыс.

Заключение. Показано снижение эндотелий зависимой релаксации сосудов при 14-дневном холодовом воздействии и ее частичное восстановление при более длительном воздействии холода (28 дней). Наблюдаемый эффект может быть следствие развития адаптационных процессов как на клеточном, так и системном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen GF, Sun Z. Effects of chronic cold exposure on the endothelin system. Journal of Applied Physiology. 2006;100(5):1719-1726. doi:10.1152/japplphysiol.01407.2005
2. Tsibulnikov SY, Maslov LN, Naryzhnaya NV, et al. Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion. Role of glucocorticoid and thyroid hormones. gpb. 2019;38(03):245-251. doi:10.4149/gpb_2019002
3. Tibenska V, Benesova A, Vebr P, et al. Gradual cold acclimation induces cardioprotection without affecting β-adrenergic receptor-mediated adenylyl cyclase signaling. Journal of Applied Physiology. 2020;128(4):1023-1032. doi:10.1152/japplphysiol.00511.2019

H_2S-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ p53 В НЕЙРОНАХ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Родькин С.В.

Научно-исследовательская лаборатория «Медицинские цифровые изображения на основе базовой модели», кафедра «Биоинженерия», Факультет «Биоинженерия и ветеринарная медицина», Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире. Вторичное повреждение при ЧМТ сопровождается каскадом молекулярно-клеточных событий, ведущих к гибели нейронов и глиальных клеток. В настоящее время отсутствуют клинически эффективные нейропротекторные препараты, что обусловлено недостаточным пониманием сигнальных механизмов, регулирующий клеточное выживание и гибель при нейротравмах [1].

Одним из ключевых факторов вторичного повреждения является окислительный стресс и апоптоз. Центральную роль в апоптотическом сигналинге играет белок p53, контролирующий экспрессию множества проапоптотических генов. В норме экспрессия p53 в клетке поддерживается на низком уровне, однако при ЧМТ наблюдается его накопление, что способствует гибели клеток [2].

Сероводород (H_2S) – газотрансмиттер, регулирующий множество различных процессов в организме, включая нейропротекторные механизмы. Исследования показывают, что H_2S может модулировать уровень p53, однако его влияние остается противоречивым: одни работы указывают на его защитный эффект за счет снижения уровня p53, тогда как другие демонстрируют его участие в запуске апоптотических процессов [3-5].

Целью данной работы является изучение роли H_2S в регуляции экспрессии p53 в нервной ткани, а также его влияния на механизмы клеточной гибели при ЧМТ.

Материалы и методы. Для моделирования ЧМТ использовался модифицированный протокол. Мышей анестезировали и фиксировали в системе для нанесения травмы. Очаговое повреждение вызывалось сбросом металлического груза (200 г) с высоты 3 см на необнажённый череп. Повреждалась теменная кора правого полушария. Вскрытие выявляло умеренный отёк и некроз в зоне удара. После выхода из наркоза мышей возвращали в клетки.

Влияние H_2S изучалось с использованием модуляторов: донора H_2S (Na_2S, 0,1 мг/кг) и ингибитора (AOAA, 5 мг/кг) цистатионин-β-синтазы (CBS), ключевого фермента синтеза H_2S. Вещества вводили внутрибрюшинно сразу после ЧМТ и ежедневно до декапитации. Контрольной группе вводили физиологический раствор.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Через 24 часа и 7 дней после ЧМТ анализировалась локализация p53 в теменной коре. Ткань фиксировали в 4% параформальдегиде, заливали в агарозу и получали срезы (20 мкм). После блокирования неспецифического связывания срезы инкубировали с первичными антителами к p53 и NeuN, затем со вторичными флуоресцентными антителами. Ядра окрашивали Hoechst 33342.

Препараты фотографировали на флуоресцентном микроскопе Altami LUM, оснащенном цифровой камерой высокого разрешения. Флуоресцентные изображения анализировали в ImageJ. Колокализацию p53 с NeuN оценивали по коэффициенту M1, усредняя данные по 100 клеткам.

Вестерн-блота. Через 24 часа и 7 дней после ЧМТ объединяли кору мозга трех в мышей. Образцы гомогенизировали ультразвуком на льду в лизирующем буфере, содержащем нуклеазу бензоназу и ингибиторы протеаз и фосфатаз. После центрифугирования супернатант отбирали для дальнейшего анализа.

Белковые образцы разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле, затем переносили на поливинилиден-дифторидную (PVDF) мембрану с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System. После промывания и инкубации в блокирующем буфере TBS мембрану инкубировали с первичными антителами: мышиным анти-p53 и анти-β-актином. После промывки в буфере TTBS мембрану инкубировали с вторичными антителами, а затем с субстратом Clarity Western ECL. Хемилюминесцентные сигналы регистрировали с помощью системы гель-документации SH-Advance523. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного пакета Vision Capt.

Определение клеточной гибели (TUNEL). Апоптоз определяли методом TUNEL через 24 часа и 7 дней после ЧМТ. После инкубации с антителами к NeuN срезы фиксировали, обрабатывали протеиназой K, а затем TdT с мечеными нуклеотидами. Контрольные срезы обрабатывали нуклеазой. Ядра окрашивали Hoechst 33342. Подсчёт TUNEL-положительных клеток проводили в 3 срезах из повреждённого и интактного полушарий у 6 мышей из каждой группы.

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 ± SEM.

Результаты и их обсуждение. Иммунофлуоресцентная микроскопия выявила локализацию p53 в нейронах, что подтверждается колокализацией с NeuN (Рис. 1А).

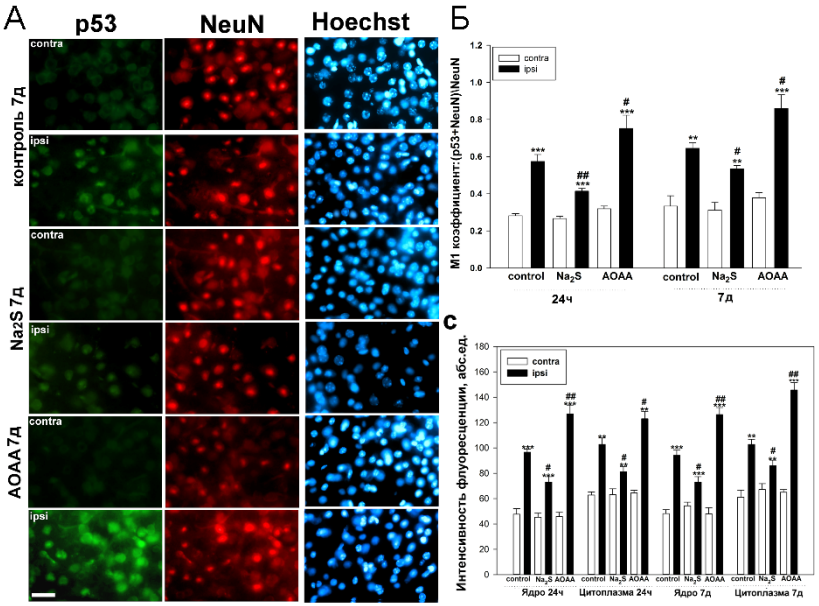


Рис. 1. (А) – Иммунофлуоресцентная микроскопия: экспрессия p53 в коре мозга контрольной и экспериментальных групп через 24 часа и 7 дней после ЧМТ. Масштаб – 20 мкм. (Б) – Коэффициент M1 колокализации p53 и NeuN через 24 часа и 7 дней после ЧМТ. (В) – Средняя интенсивность флуоресценции p53 в нейронах. Contra – контралатеральная кора, Ipsi – ипсилатеральная кора. **p<0.01, ***p<0.001 – ипсилатеральная *vs.* контралатеральной коры; #p<0.05, ##p<0.01 – экспериментальная *vs.* контрольной группы.

Коэффициент колокализации M1 в ипсилатеральной коре увеличивался 2 раза через 24 часа относительно контралатеральной стороной (p<0.001) после ЧМТ. Эта тенденция сохранялась через 7 дней (p<0.01). Введение Na_2S снижало уровень p53 на 28% (p<0.01) и 18% (p<0.01), а ингибирование CBS (AOAA) приводило к росту экспрессии p53 на 34% (p<0.05) и 38% (p<0.05) через 24 часа и 7 дней относительно контроля (Рис. 1Б). Оценка интенсивности флуоресценции p53 в ядре нейронов подтверждает данные коэффициента M1. Схожая динамика наблюдалась в цитоплазме (Рис. 1В).

Данные флуоресцентной микроскопии подтверждают результаты, полученные в ходе вестерн-блот анализа общей фракции нервной ткани головного мозга (Рис. 2). Экспрессия p53 через 24 часа после ЧМТ возрастала в ипсилатеральной коре: в контрольной группе на 71% ($p<0.01$), при введении Na_2S – на 42% ($p<0.01$), а при ингибировании CBS (AOAA) – в 2.5 раза ($p<0.01$) относительно контралатеральной стороны. При этом Na_2S снижал уровень p53 в зоне повреждения на 36% ($p<0.01$) по сравнению с контролем, тогда как AOAA увеличивал его на 49% ($p<0.05$) (Рис. 2А). Подобная динамика сохранялась и через 7 дней после ЧМТ (Рис. 2Б).

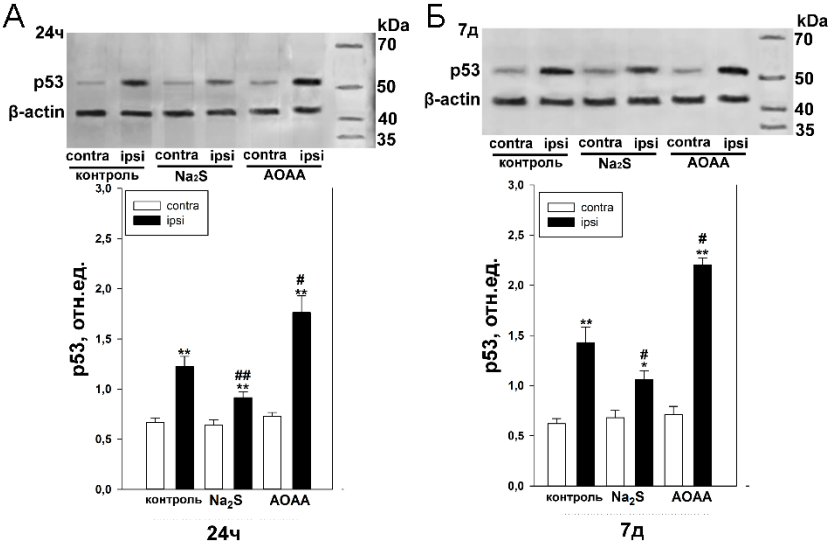


Рис. 2. Вестерн-блот анализ влияния Na_2S и AOAA на экспрессии белка p53 в контралатеральной и ипсилатеральной коре. (А) – через 24 часа после ЧМТ. (Б) – через 7 дней после ЧМТ. *$p<0.05$, **$p<0.01$ – ипсилатеральная *vs.* контралатеральной коры одного животного; #$p<0.05$, ##$p<0.01$ – ипсилатеральная кора экспериментальной группы *vs.* ипсилатеральной корой контрольной группы в течение одного периода времени после травмы.

Известно, что уровень p53 в нормальной ткани строго регулируется путем протеасомной деградации через убиквитинирование ферментом MDM2, а также модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и гликозилирование. Однако клеточный стресс, в том числе индуцированный ЧМТ, быстро активирует p53 через различные сигнальные механизмы [2].

Наши результаты хорошо согласуются с концепцией нейропротекторного действия H_2S. Известно, что ингибирование CBS во многих исследованиях приводило к развитию окислительного стресса и апоптоза. В условиях ЧМТ дополнительное ингибирование CBS и, как следствие, дефицит H_2S, усиливают проапоптотический сигналинг, что приводит к увеличению экспрессии p53 и гибели нейронов [3-5].

Введение Na_2S, напротив, снижало уровень p53, что подтверждает участие H_2S в регуляции проапоптотических процессов. Этот эффект, вероятно, связан со способностью H_2S уменьшать окислительный стресс, ингибировать сигнальные пути, активирующие p53, и поддерживать антиапоптотическую активность [3].

Методом TUNEL, маркирующим ядра апоптотических клеток, нам удалось установить, что гибель нейронов после ЧМТ была максимальной в контрольной группе, усиливалась при введении AOAA и снижалась под действием Na_2S. Через 24 часа после травмы число нейронов в ипсилатеральной коре увеличивалось в 7.2 раза ($p<0.001$) в контроле, в 4.3 раза ($p<0.001$) при Na_2S и в 9 раз ($p<0.001$) при AOAA относительно контралатеральной стороны. При этом Na_2S снижал гибель нейронов на 38% ($p<0.05$) по сравнению с контролем, тогда как AOAA увеличивал её на 50% ($p<0.05$). Данная динамика сохранялась и через 7 дней (Рис. 3Б).

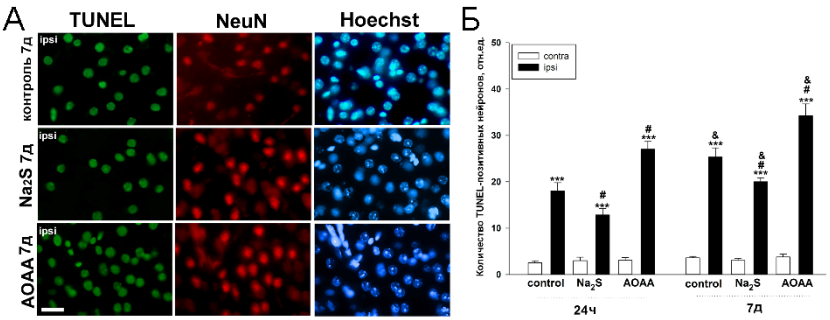


Рис. 3. Метод TUNEL. (А) – Кортикальные срезы, окрашенные TUNEL, контрольной и экспериментальных группы через 24 часа и 7 дней после ЧМТ. Масштабная линейка 20 мкм. (Б) – Число TUNEL-позитивных нейронов через 24 часа и 7 дней ЧМТ. **p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 – ипсилатеральная кора *vs.* контралатеральной коры одного животного; #p<0.05, ##p<0.01 – ипсилатеральная кора экспериментальной группы *vs.* ипсилатеральной коры контрольной группы.

Эти результаты подтверждают прошлые исследования, в которых было показано, что TUNEL-позитивная реакция нейронов проявляется уже в первые часы после ЧМТ и усиливается с течением времени, достигая пиковых значений через несколько дней. Использование донора H_2S в

нашем исследовании приводило к уменьшению уровня апоптоза нейронов, что подтверждает нейропротекторный эффект H_2S. Обратный эффект достигался в группах, которым вводили AOAA. Во многих исследованиях было показано, что CBS играет важную роль в регуляции клеточной гибели при нейротравмах. При этом сообщается, что введение экзогенного донора H_2S может восстанавливать уровень CBS при ЧМТ [3]. Мы предполагаем, что одним из ключевых нейропротекторных механизмов H_2S в нейронах может быть p53-зависимый сигнальный путь. В нашем исследовании уровень экспрессии p53 напрямую коррелировал с введением донора H_2S или ингибитора CBS в условиях травматического повреждения нервной ткани.

Наше исследование подтвердило, что экспрессия p53 существенно возрастает в зоне повреждения после ЧМТ, способствуя активации проапоптотических процессов. Введение доноров H_2S снижало уровень p53 и уменьшало гибель нейронов, тогда как ингибирование CBS приводило к противоположному эффекту. Полученные данные указывают на важную роль H_2S в регуляции p53-зависимых механизмов клеточного ответа при ЧМТ. Это подтверждает перспективность H_2S как нейропротекторного агента и открывает возможности для дальнейшего изучения его терапевтического потенциала.

Работа выполнена за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FZNE-2024-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. Med Clin North Am. 2020;104(2):213-238.
2. Napieralski JA, Raghupathi R, McIntosh TK. The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. Brain Res Mol Brain Res. 1999;71(1):78-86.
3. Zhang J, Zhang S, Shan H, Zhang M. Biologic Effect of Hydrogen Sulfide and Its Role in Traumatic Brain Injury. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:7301615.
4. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H2S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. Biochem Pharmacol. 2018;149:110-123
5. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. Antioxid Redox Signal. 2012;17(1):119-140.

ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Семерня Е.П.[1], Солдатова А.В.[1], Сариев А.У.[1,2], Варламова Е.Г.[3], Гудков С.В.[5], Туровский Е.А.[3], Баев А.Ю.[1,4]

[1]Центр передовых технологий, Ташкент, Узбекистан
[2]University of Connecticut School of Medicine, Farmington, USA
[3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
[4]НУУз им. Мирзо Улугбека, Ташкент, Узбекистан
[5]ФГБУ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

Введение. Ишемический инсульт – одно из наиболее тяжёлых и распространённых острых поражений центральной нервной системы, сопровождающееся значительной летальностью и высокой вероятностью инвалидизации [1]. Учитывая ограниченные возможности современной терапии, сфокусированной преимущественно на восстановлении перфузии, всё большую значимость приобретают подходы, направленные на нейропротекцию и поддержку восстановительных процессов в постишемическом периоде [2].

Как известно одним из ключевых медиаторов повреждения при ишемии является **окислительный стресс**, обусловленный многократной активацией продукции активных форм кислорода (АФК). АФК в условиях ишемии и реперфузии формируются за счёт различных источников: митохондрий, ксантиноксидазы (XO) и NADPH-оксидазы, при этом наибольший вклад в гибель клеток связан с активацией NADPH-оксидазы на этапе реоксигенации. Этот процесс сопровождается угнетением митохондриальной функции, истощением глутатиона, усилением липидной пероксидации и массовой гибелью нейронов и астроцитов в нейроглиальных культурах коры головного мозга [3]. В ответ на ишемическое повреждение активируются микроглия и астроциты, выделяющие провоспалительные цитокины (TNF-α, IL-1β, IL-6), которые усиливают проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В свою очередь разрушение ГЭБ ведёт к **формированию отёка мозга**, инфильтрации иммунных клеток и усилению нейровоспаления. Повреждение и гибель клеток в зоне ишемического очага и пенумбры приводят к снижению пластичности нейросетей и нарушению передачи сигналов между отделами мозга. Это проявляется в **нарушениях когнитивных и моторных функций**, включающих дефициты памяти, ориентации, двигательной координации и поведения, что может сохраняться даже при частичном восстановлении кровотока [4].

На этом фоне важным направлением современных исследований является поиск соединений, способных модулировать окислительный стресс, подавлять воспалительные реакции и активировать клеточные механизмы выживания. Среди таких агентов активно изучаются **наночастицы селена (SeNPs)**, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Было показано, что они проявляют выраженные цитопротективные свойства в отношении кортикальных астроцитов *in vitro* в условиях ишемии/реоксигенации. Этот эффект реализуется через подавление повышения цитозольного Ca^{2+} и индукцию астроглиоза типа А2, что сопровождается активацией PI3K и подавлением некроза и апоптоза [5]. Также выявлено что под действием SeNPs в астроцитах активируются Ca^{2+}-зависимые сигнальные пути, приводящие к открытию гемиканалов Cx43 и высвобождению лактата и АТФ. Лактат, выделяемый астроцитами, не только участвует в межклеточной сигнализации, но и выполняет нейроподдерживающую роль в условиях ишемического повреждения, выступая компонентом цитопротективного действия селена [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение нейропротекторного потенциала наночастиц селена в условиях ишемического повреждения мозга. Оценка проводилась как на клеточном уровне — с анализом продукции активных форм кислорода, так и на уровне целостного организма — по неврологическим и гистологическим показателям постишемического восстановления.

Материалы и методы. Для экспериментов использовались 2 вида наночастиц селена – сферической и удлиненной (nanorods) формы. Моделирование ишемических условий *in vitro* проводилось на первичной нейроглиальной культуре клеток, полученной из коры головного мозга неонатальных крыс. Ишемия индуцировалась добавлением CO-реализующей молекулы CORM-401 (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 60 мкМ, затем осуществлялась реперфузия путём полной отмывки среды спустя 35–40 минут. Для оценки продукции активных форм кислорода клетки загружали красителем дигидроэтидиумом (HEt, 10 мкМ), с последующей регистрацией флуоресценции на инвертированном флуоресцентном микроскопе. Чтобы оценить эффект селеновых наночастиц, клетки обрабатывали ими в одном ряде экспериментов сразу, в другом – преинкубировали в течение 24 часов в концентрации 5 мкг/мл.

Для подтверждения результатов *in vitro* и оценки нейропротективных свойств селеновых наночастиц в условиях целостного организма была применена *in vivo* модель фокальной ишемии мозга у крыс. В эксперименте использовались крысы-самцы (возраст 8 недель и старше, масса тела 220–280 г). Модель фокального ишемического инсульта осуществляли модифицированным нами методом временной

окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА), при котором после реперфузии общая сонная артерия зашивается и тем самым создаются условия более приближенные к реальному течению заболевания. Животные были разделены на три группы: контрольная, получавшая инъекции физраствора, экспериментальная с введением сферических наночастиц селена и экспериментальная с введением дендритных наночастиц. Оценка неврологических нарушений включала в себя следующие тесты, которые проводились в течение 48 часов после ОСМА: тест на беговой планке, тест на кручения, тест на касания и шкала Бедерсона для количественной оценки дефицита.

Гистологическая оценка площади инфаркта мозга проводилась на вторые сутки после операции. Мозг извлекали, нарезали на слайсы и окрашивали 0.2% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТС). Измерение площади инфаркта выполнялось с помощью программы ImageJ на отсканированных срезах мозга крысы.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программы Origin Pro 2021. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартной ошибки среднего (SEM). Для анализа статистической значимости различий между зависимыми выборками применяли дисперсионный анализ с повторными измерениями (One-Way Repeated Measures ANOVA) с последующим post hoc тестом Тьюки.

Результаты. Учитывая ключевую роль окислительного стресса в механизмах клеточного повреждения при ишемии и особенно в фазе реперфузии, на первом этапе исследования было проведено изучение влияния наночастиц селена на уровень продукции активных форм кислорода в нейроглиальной культуре коры головного мозга на модели ишемии, вызванной острой токсичностью угарным газом. Обработка клеток обоими видами наночастиц селена привела к значительному ингибированию продукции АФК в зоне реперфузии, как для нейронов, так и для астроцитов, что подразумевает прямое или опосредованное влияние наночастиц селена на NADPH оксидазу [3].

Полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенных ранее в ИБК [7]. При ишемии избыточное выделение глутамата приводит к активации рецепторов NMDA и AMPA, что усиливает приток кальция в клетки и активирует окислительный стресс через NADPH оксидазу. Наночастицы селена, снижая уровень кальциевых сигналов и подавляя активность NADPH оксидазы, могут разрывать этот патологический каскад, тем самым предотвращая гибель клеток.

Применение наночастиц селена в качестве терапии ишемического инсульта на *in vivo* модели приводило к значимому снижению выраженности постишемических нарушений по всем оценочным

критериям. В контрольной группе окклюзия средней мозговой артерии обуславливала значительное увеличение времени прохождения крысы по балансовой планке в 4 раза и составляла в среднем 6,3 и 6,6 секунд на 1-й и 2-й день после операции, соответственно. Постоперационное же введение наночастиц селена обоих видов уменьшало постинсультные функциональные нарушения и улучшало показатели скорости прохождения крыс по балансовой планке. Аналогичные результаты наблюдались также в тесте на асимметрию вращения и в тесте на касания. Так, сферические наночастицы снижали показатели асимметрии в 11 раз на вторые сутки по сравнению с не леченной группой. Несмотря на большую эффективность сферических наночастиц по неврологическим параметрам, их действие не оказало какого-либо влияния на площадь инфаркта, а также на общее состояние животных, которое оценивалось по шкале Бедерсона. Влияние наночастиц второго типа, дендритных, напротив имело более выраженный характер и достоверно снижало площадь инфаркта мозга почти в 3 раза, что означает их протекторное воздействие на зону пенумбры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li X-y, Kong X-m, Yang C-h, Cheng Z-f, Lv J-j, Guo H, Liu X-h: Global, regional, and national burden of ischemic stroke, 1990–2021: an analysis of data from the global burden of disease study 2021. *eClinicalMedicine* 2024, 75.
2. Kuriakose D, Xiao Z: Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2020, 21.
3. Angelova PR, Myers I, Abramov AY: Carbon monoxide neurotoxicity is triggered by oxidative stress induced by ROS production from three distinct cellular sources. *Redox Biol* 2023, 60:102598.
4. Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, Zhou LQ, Chen M, Tian DS, Wang W: Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2022, 7:215.
5. Varlamova EG, Plotnikov EY, Baimler IV, Gudkov SV, Turovsky EA: Pilot Study of Cytoprotective Mechanisms of Selenium Nanorods (SeNrs) under Ischemia-like Conditions on Cortical Astrocytes. In *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24; 2023.
6. Varlamova EG, Turovsky EA, Babenko VA, Plotnikov EY: The Mechanisms Underlying the Protective Action of Selenium Nanoparticles against Ischemia/Reoxygenation Are Mediated by the Activation of the Ca(2+) Signaling System of Astrocytes and Reactive Astrogliosis. *Int J Mol Sci* 2021, 22.
7. Turovsky EA, Mal'tseva VN, Sarimov RM, Simakin AV, Gudkov SV, Plotnikov EY: Features of the cytoprotective effect of selenium nanoparticles on primary cortical neurons and astrocytes during oxygen–glucose deprivation and reoxygenation. *Scientific Reports* 2022, 12:1710.

Особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ PCSK9 И АДРОННОЙ ТЕРАПИИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО С МУТАЦИЕЙ STK11 УСИЛИВАЕТ ОНКОСУПРЕССОРНЫЙ ЭФФЕКТ

Ганцова Е.А.[1,2], Арутюнян И.В.[1,2], Шакирова К.М.[1,3], Соболева А.Г.[1,2], Кананыхина Е.Ю.[2], Бальчир Д.Б.[1], Гордон К.Б.[1], Фатхудинов Т.Х.[1,2]

[1]НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия
[2]НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия
[3]ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. На 2021 год рак легких остается наиболее распространенным онкологическим заболеванием по показателям заболеваемости и смертности. В России каждый год фиксируется 43 500 случаев этой болезни, что приводит к 37 500 летальным исходам. Аденокарцинома легких — самый распространенный подтип, который выявляется у 40% пациентов, включая некурящих. Мутации в гене STK11/LKB1 встречаются в 20-30% случаев и способствуют рецидивам и метастазированию, а также связаны с неблагоприятным прогнозом и устойчивостью к лечению. Данные TCGA показывают, что у пациентов с мутациями STK11/LKB1 наблюдается значительное снижение экспрессии гена и ухудшение выживаемости [1].

Адронная терапия (АТ) применяет нестандартные частицы, такие как протоны и нейтроны, для точной доставки радиации, что минимизирует повреждение здоровых тканей. Исследования подтверждают высокую биологическую эффективность АТ, особенно при местно-распространенном немелкоклеточном раке легких (НМРЛ), с меньшей серьезностью побочных эффектов [2-3].

Несмотря на достижения в области таргетной и иммунотерапии, лечение STK11/LKB1-мутантной аденокарциномы легких (LUAD) продвигается медленно. Анализ данных TCGA показал, что повышенная экспрессия PCSK9 связана с плохой выживаемостью у пациентов с мутациями STK11/LKB1.

Целью работы является оценка комбинированного влияния адронной терапии и ингибитора PCSK9 эволокумаба на клеточную линию A549-STK11-Mut с мутацией гена STK11/LKB1.

Материалы и методы.

Внесение STK11-Mut с помощью CrispCas9 системы. Для создания нокаутирующих делеций подбирали пары sgRNA (single guide RNA) таким образом, чтобы расстояние между ними было больше 100 пн. Подбор и дизайн sgRNA проводили с помощью онлайн-ресурса CRISPOR.TEFOR.NET, синтез олигонуклеотидов заказывали в компании Люмипроб (Россия). Олигонуклеотиды фосфорилировали при помощи полинуклеотидкиназы T4 Polynucleotide Kinase (NEB, США). Векторную плазмиду pU6-sgRNA подвергалии рестрикции эндонуклеазой BstV2I (изошизомер BbsI) (СибЭнзим, Россия), дефосфорилировали липкие концы с помощью фосфатазы креветки Shrimp Alkaline Phosphatase (NEB, США) и очищали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с последующим выделением из геля набором Clean up standart (Евроген). Лигирование олигонуклеотидов в вектор проводили с помощью T7 DNA Ligase (NEB, США). Далее проводили трансформацию компетентных клеток E.Coli XL1-Blue. Клоны анализировали на наличие вставки методом ПЦР с использованием 5x Screen mix (Евроген, Россия) с последующей визуализацией с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Электропорация клеток, лазерный сортинг. Для создания значащих делеций с помощью электропорации доставляли в клетки 6 мкг плазмиды pCas9-IRES-EGFP, несущую ген Cas9 в сочетании с маркерным флуоресцентным белком EGFP, а также пары плазмид, несущие sgRNA. Для одной реакции ресуспендировали $4x10^6$ клеток в 400 мкл DPBS (ПанЭко, Россия) и добавляли к суспензии смесь плазмид. Электропорацию проводили в электропораторе «Gene Pulser Xcell» (Bio-Rad, США) Через 72 часа после электропорации, производили сортировку клеток по зеленому сигналу EGFP для обогащения популяции успешно трансфецированными клетками. После культивирования трансфецированные клетки сортировали по сигналу репортерного белка GFP на приборе BD FACSAria III и визуализировали на ZOE Fluorescent Cell Imager (Biorad, США). Полученные клеточные линии далее в тексте будут обозначаться как A549-STK11-Mut.

ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью реагента MagZol (Magen, КНР) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с 0,5 мкг тотальной РНК на реакцию с использованием набора MMLV-RT (Евроген, Россия) при 42°C в течение 40 мин. Смеси для ПЦР в реальном времени готовили в реакционном объеме 20 мкл, содержащем 100 нг кДНК, 0,3 мкМ олигонуклеотидных праймеров и 4 мкл 5xSybrGreen-mix (Евроген, Россия) в трехкратной повторности. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе DTPrime 5 (ООО «ДНК-Технология», Россия) с использованием

следующей программы ПЦР: начальный этап при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов денатурации при 94°C в течение 15 с, отжиг при 62°C в течение 10 с и элонгация при 72°C в течение 20 с. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов рассчитывали как 2^(-deltaCt), где deltaCt были равны среднему Ct генов за вычетом среднего Ct гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Результаты. Для человеческой линии получили три клона, несущие делецию A549-STK11-Mut 253-408 и 266-454 (номера соответствуют нуклеотидам делеции), которые обозначили K1 A549, K3 A549 и K9 A549. На базе Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба в г. Обнинск было проведено облучение тремя типами частиц: фотонами, протонами и нейтронами. В качестве дозы облучения была выбрана стандартная доза 2 Гр (или эквивалент), которая обычно используется для пациентов в качестве однократной дозы, а также применяется в других исследованиях на клеточных линиях. После облучения к части клеток добавляли ингибитор PCSK9 эволокумаб. В эксперименте, направленном на поиск наиболее устойчивого к терапии частицами клона, концентрация эволокумаба составляла 0,1 мг/мл, в контрольной группе ингибитор не добавляли. Было проведено исследование экспрессии генов после облучения и при добавлении эволокумаба (0,1 мг/мл) методом количественной ПЦР в реальном времени. В качестве генов интереса для линий A549 и трёх клонов (K1, K3 и K9) A549-STK11-Mut использовали следующий список генов: AURKA, Ki67, TGFb, Vimentin, p53, ALDH1a1, CD44, PTEN. По данным ресурса Protein Atlas все эти гены экспрессируются в данной клеточной линии. Так же, выбирая гены интереса, в первую очередь рассматривали гены, связанные с изменениями, которые происходят в A549 после облучения, либо связаны с радиочувствительностью. Линия A549 часто используются в качестве примера радиоустойчивой линии при сравнении с другими, более чувствительными. Гены TGFB1 и Vimentin связаны с радиоиндукцией эпителиально-мезенхимального перехода, CD44 и ALDH1A1- гены "стволовости" опухолевых клеток, p53 и PTEN – гены-онкосупрессоры, ген AURKA регулирует активность митохондрий. На рисунках 17 и 18 приложения показаны результаты ПЦР для генов PTEN, ALDH1a1 и Vimentin, именно в экспрессии этих генов мы обнаружили значительное изменение. Для гена PTEN мы видим значительный прирост экспрессии в линии клона K3 на 1 сутки после облучения, и значительное снижение на 3 сутки. Такое же значительное повышение наблюдали на 1 сутки у генов ALDH1a1 и Vimentin, так же для клона 3 K3-A549-STK11-Mut.

В результате проведенного эксперимента по облучению трех клонов клеточной линии A549-STK11-Mut с использованием ингибитора PCSK9 эволокумаба было выявлено значительное изменение экспрессии

генов PTEN, ALDH1a1 и Vimentin, особенно у клона К3, что указывает на перспективность данного клона для дальнейшего изучения радиочувствительности и механизмов устойчивости к терапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-45-00031.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu X, Bao X, Hu M, Chang H, Jiao M, Cheng J, Xie L, Huang Q, Li F, Li CY. Inhibition of PCSK9 potentiates immune checkpoint therapy for cancer. Nature. 2020 Dec;588(7839):693-698. doi: 10.1038/s41586-020-2911-7.
2. Gulidov I, Koryakin S, Fatkhudinov T, Gordon K. External Beam Fast Neutron Therapy: Russian Clinical Experience and Prospects for Further Development. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2023 Mar 15;115(4):821-827. doi: 10.1016/j.ijrobp.2022.11.004.
3. Kiseleva V, Gordon K, Vishnyakova P, Gantsova E, Elchaninov A, Fatkhudinov T. Particle Therapy: Clinical Applications and Biological Effects. Life (Basel). 2022 Dec 9;12(12):2071. doi: 10.3390/life12122071.

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ АПТАМЕРАМИ ПОДАВЛЯЕТ РОСТ ГЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ *IN VIVO*

Горбушин А.К.[1], Воронковский И.И.[1], Грек Д.С.[1], Лузан Н.А.[1], Кошманова А.А.[1,2], Народов А.А.[1], Замай Г.С.[1,2], Коловская О.С.[1,2], Федотовская В.Д.[1,2], Лукьяненко К.А.[1,2], Замай Т.Н.[1,2], Vittorio de Franciscis[3], Кичкайло А.С.[1,2]

[1]Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия
[2]ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия
[3]Istitute for Experimental Endocrinology and Oncology, Research National Council (CNR), Naples, Italy

Введение. Среди всех злокачественных новообразованиях мозга мультиформная глиобластома (ГБМ) является наиболее распространенной, самой летальной и трудно поддающейся лечению, медиана выживаемости которой составляет в среднем 10 месяцев. Частота рецидивов заболевания очень высока, обычно прогрессирующее заболевание быстро развивается, и пациент умирает в течение нескольких месяцев [1]. Недостатком терапии ГБМ является их недостаточная эффективность, поскольку воздействует только на небольшую популяцию стволовых опухолевых клеток, способных повторно заселять опухоль. Поэтому разработка стратегий терапии, позволяющей осуществлять деструкцию стволовых глиальных клеток, представляет собой важную задачу.

Перспективными средствами для лечения онкологических заболеваний, в том числе агрессивной ГБМ являются терапевтические олигонуклеотиды, а потенциальными терапевтическими мишенями – факторы транскрипции и микроРНК, поддерживающие способность глиальных стволовых клеток стимулировать развитие опухоли и инвазию опухолевых клеток. Однако исследования показали, что доставка препаратов к терапевтическим мишеням остается сложной задачей, для разрешения которой в последнее десятилетие стали использовать аптамеры, обладающие высокой аффинностью и специфичностью по отношению к своим мишени, легкостью проникновения в опухоль и возможностью их химических модификаций для придания им нужных свойств [2,3]. В работе исследовалась противоопухолевая активность бифункциональной молекулы на основе аптамера к глиальным стволовым клеткам GL21.T и ингибирующей малой интерферирующей микроРНК – анти-miR10b.

Материалы и методы. Для разработки комбинированной стратегии, позволяющей воздействовать на стволоподобные клетки опухоли в качестве направляющей молекулы для доставки терапевтической РНК был использован аптамер GL21.T. Ортотопическую ксенотрансплантацию глиальной опухоли человека проводили белым лабораторным мышам после иммуносупрессии. Контроль роста опухоли осуществляли на 14-й и 21-й день после трансплантации глиальных опухолевых клеток с помощью МРТ и гистологического исследования. Для оценки накопления химеры аптамера к стволовым глиальным клеткам, модифицированного miR10b, *in vivo* проводили в системе визуализации Fluor i In Vivo на длинах волн от 680 до 700 нм. Для *ex-vivo* визуализации свежие органы размещали на пластинах и оценивали их флуоресценцию с использованием системы Fluor i In Vivo. Терапию животных с перевитой внутримозговой опухолью человека начинали на 21 день после трансплантации опухоли. Ход лечения контролировали с помощью МРТ на 1, 6 и 9 день лечения.

Результаты. Для доказательства адресной доставки химеры анти-miR10b-GL21.T-Cy5 было проведено определение его в органах и тканях путем флуоресцентной визуализации комплекса *in vivo*. Результаты исследований показали, что аптамеры к стволовым глиальным клеткам в комплексе с анти-miR10b эффективно распознавали астроцитарные опухоли с высокой чувствительностью и селективностью. Изображения мышей через 1 час после внутривенной инъекции показали, что молекулярный зонд селективно локализовался в целевой опухолевой ткани, а также в основных органах выведения – печени и почках (Рис. 1).

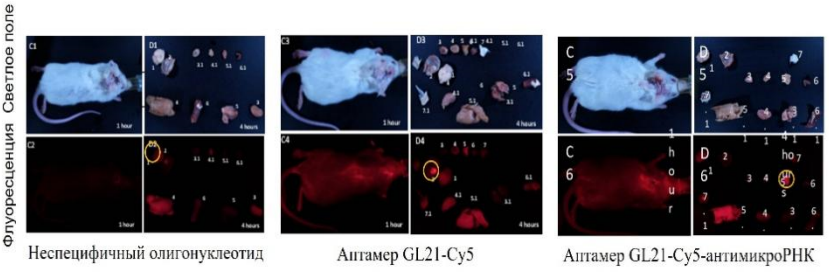


Рис. 1. Распределение неспецифичного аптамера с меткой Cy5, аптамера GL21-Cy5, аптамера GL21-Cy5-антимикроРНК у мышей после инъекции этих препаратов в хвостовую вену, зарегистрированное в светлом поле и в красной флуоресценции.

Эффективность терапии глиобластомы с помощью химеры GL21.T-miR10b оценивали методом МРТ, продемонстрировавшем, что лечение химерой трансплантированных мышиных астроцитарных опухолей увеличивало количество некротических и отечных зон в опухолях мозга мышей, в то время как нелеченые глиомы были большими по размеру и с меньшим количеством некрозов. В ходе работы было показано, что у мышей без лечения, а также у животных после терапии неспецифичным аптамером, трансплантированная опухоль головного мозга развивалась и увеличивалась в размерах.

Гистологические исследования продемонстрировали наличие некротических участков и зон ангиогенеза в тканях. Применение химерного препарата аптамера к глиальным стволовым клеткам с miR10b приводило к полному некрозу с последующим глиозом в области опухолевого роста, при этом здоровые нейроны оставались неповрежденными.

Таким образом, в процессе выполнения работы была создана адекватная модель человеческой глиобластомы в головном мозге мышей с медикаментозной иммуносупрессией, что было подтверждено результатами магнитно-резонансной томографии (МРТ), флуоресцентной визуализации *in vivo* и гистологическими исследованиями. Применение химерных аптамеров, комбинированных с малыми терапевтическими РНК, продемонстрировало терапевтический эффект, проявляющийся в уменьшении объема опухолевого образования.

Заключение. Для разработки комбинированной стратегии, позволяющей адресно воздействовать на стволовые глиальные опухолевые клетки, была использована химера аптамера GL21.T, который связывается с рецепторной тирозинкиназой AXL, сверхэкспрессированной и вовлеченной в несколько типов опухолей, включая мультиформную глиобластому, терапевтического олигонуклеотида анти-miR10b (Рис.2). miR10b – ключевой регулятор высокоагрессивного мезенхимального подтипа глиобластомы, а также выживания и размножения глиальных стволовых клеток.

Результаты исследований показали, что химерная молекула, содержащая анти-AXL аптамер GL21.T и одноцепочечный антагонист miR10b (GL21.T-анти-miR10b) предотвращает рост опухоли и пролиферацию глиальных стволовых клеток. Биологический эффект химеры GL21.T-10b был обнаружен *in vivo* на иммуносупрессированных мышах с ксенотрансплантированной человеческой глиобластомой.

Таким образом, полученные результаты исследований представляют собой фундаментальную базу для разработки эффективных бифункциональных препаратов, содержащих терапевтический олигонуклеотид и ингибирующую малую интерферирующую микроРНК,

для полного уничтожения опухоли глиобластомы и улучшения результатов лечения пациентов [4-6]. Полученные результаты служат основой для разработки эффективных терапевтических стратегий на основе малых РНК, сочетающихся с аптамерами для таргетной доставки к опухолевым образованиям. Данные исследования создают предпосылки для разработки новых лекарственных средств, направленных на лечение труднодиагностируемых опухолей головного мозга, демонстрируя значительный потенциал для полного уничтожения злокачественных клеток.

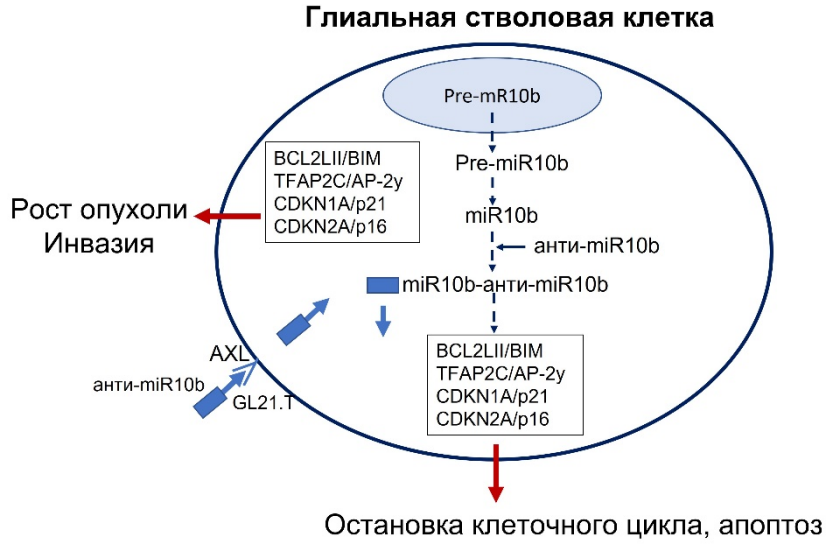


Рис. 2. Механизм адресной деструкции глиальных стволовых клеток с помощью химеры GL21.T-анти-miR10b.

Благодарности. Получение химерной наноконструкции GL21.T-анти-miR10b выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проекта № FWES-2022-0005. Выполнение экспериментов по оценке противоопухолевого эффекта химерной наноконструкции GL21.T-анти-miR10b выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках госзадания «Разработка препарата на основе малой интерферирующей РНК, подавляющей экспрессию гена STAT3 для лечения глиальных опухолей мозга» №123031000006-4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor OG, Brzozowski JS, Skelding KA. Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. Frontiers in Oncology. 2019;(9):963.
2. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY. Th e transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. Nature. 2010;(463):318–325.
3. Kwiatkowska A, Symons M. Signaling determinants of glioma cell invasion. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2013;(986):121–141.
4. Esposito CL, Catuogno S, Condorelli G, Ungaro P, de Franciscis V. Aptamer Chimeras for Therapeutic Delivery: The Challenging Perspectives. Genes (Basel). 2018;(9):11.
5. Esposito CL, Nuzzo S, Catuogno S, Romano S, de Nigris F, de Franciscis V. STAT3 Gene Silencing by Aptamer-siRNA Chimera as Selective Therapeutic for Glioblastoma. Molecular Therapy – Nucleic Acids. 2018;(10):398-411.
6. Esposito CL, Nuzzo S, Ibba ML, Ricci-Vitiani L, Pallini R, Condorelli G, Catuogno S, de Franciscis V. Combined targeting of glioblastoma stem-like cells by neutralizing RNA-bio-drugs for STAT3. Cancers. 2020;12(6):1434.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ CD33+ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА К ДЕЙСТВИЮ АНТРАЦИКЛИНОВ В ТРЕХМЕРНЫХ КУЛЬТУРАХ

Краснов К.С.[1,2], Мещерякова Е.И.[1,3], Ломовская Я.В.[1], Фадеева И.С.[1], Кобякова М.И.[1], Фадеев Р.С.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
[2]Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия
[3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Введение. Острый миеломонобластный лейкоз (ОММЛ) – самая распространённая форма острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) – представляет собой злокачественную опухоль миелоидного ростка гемопоэтической системы. Для него характерны активная пролиферация и клональная экспансия бластных клеток, представленных предшественниками гранулоцитов и моноцитов, что приводит к нарушению нормального гемопоэза и подавлению иммунитета [1]. Несмотря на достижения современной фармакологии и онкогематологии данное заболевание характеризуется крайне низкой пятилетней выживаемостью у больных старше 60 лет, где она составляет менее 10% [1]. В настоящее время, применение химиотерапевтических препаратов, включая группу антрациклинов (доксорубицин, идарубицин и т.д.), с последующей трансплантацией костного мозга остается основным способом лечения ОММЛ [2]. Эффективность применения химиотерапевтических препаратов ограничивается возникновением резистентности у лейкозных клеток к их действию [3]. Ранее в своих работах при использовании постоянных клеточных линий, мы обнаружили повышение устойчивости лейкозных клеток в составе трехмерных многоклеточных агрегатов к действию ряда противоопухолевых агентов по сравнению с теми же клетками, но культивируемыми в виде одиночной суспензии [4,5]. Повышение лекарственной устойчивости хорошо описано для клеток солидных опухолей (карцином, сарком и т.д.), культивируемых в составе многоклеточных агрегатов или сфероидов [6]. В тоже время механизмы лекарственной устойчивости лейкозных клеток в трехмерных многоклеточных агрегатах остаются во многом не изучены. В представленной работе показано повышение устойчивости первичных CD33+ клеток острого миеломонобластного лейкоза к цитотоксическому действию антрациклинов в трехмерных многоклеточных агрегатах, которое сопровождалось подавлением проапоптотического сигнального

пути, частичным накоплением клеток в G_0/G_1-фазе клеточного цикла и увеличением содержания антиапоптотического белка Bcl-2.

Материалы и методы. В работе использовали первичные CD33+ миелоидные клетки, выделенные из аспиратов костного мозга 10 пациентов с острым миеломонобластным лейкозом (FAB M4), любезно предоставленные отделением клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Клетки культивировали в среде IMDM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 80 мкг/мл гентамицина при 37°C, в условия 5% содержания CO_2 в воздухе. Для формирования трехмерных многоклеточных агрегатов 2 мкл суспензии, содержащей $2,5*10^4$ CD33+ клеток в среде IMDM с 20% эмбриональной телячьей сыворотки, инокулировали в лунку 96-луночного планшета, содержащего 200 мкл среды следующего состава (1% раствор метилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, США) в среде IMDM, с содержанием 20% эмбриональной телячьей сыворотки) и инкубировали при 37°C, в условия 5% содержания CO_2 в воздухе. Через 24 часа в каждой лунке находился трехмерных агрегат клеток [7]. Для получения культуры одиночных клеток и предотвращения агрегации 100 мкл суспензии CD33+ клеток смешивали 1:1 со средой следующего состава (2% раствор метилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, США) в среде IMDM, с содержанием 20% эмбриональной телячьей сыворотки) и аккуратно перемешивали. Далее полученную суспензию клеток, с помощью механической пипетки с позитивным вытеснением, переносили в лунку 96-луночного планшета и инкубировали при 37°C, в условия 5% содержания CO_2 в воздухе. Через 24 часа в каждой лунке находилась суспензия одиночных клеток. Жизнеспособность клеток после инкубации с гидрохлоридом доксорубицина, гидрохлоридом эпирубицина или гидрохлоридом идарубицина (Sigma-Aldrich, США) оценивали по интенсивности восстановления метаболического индикатора AlamarBlue (Sigma-Aldrich, США) с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinity F 200 (Tecan, Австрия) [4, 5, 8]. Исследование экстернализации фосфотидилсерина проводили с помощью флуоресцентного коньюгата Annexin V-FITC (Sigma-Aldrich, США) с использованием проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США). Анализ ферментативной активности каспазы 3 проводили с помощью флуоресцентного субстрата Ac-DEVD-amc (Enzo Life Sciences, USA) с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinity F 200 [8]. Анализ экспрессии ядерного антигена Ki-67 проводили с помощью PE anti-human Ki-67 (Biolegend, США) на проточном цитометре Accuri C6 [4]. Для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки фиксировали 70% этанолом (1 ч, -20°C), после чего окрашивали в среде следующего состава: 100 мМ фосфатно-солевой буфер, 0,1% тритон X100,

10 мкг/мл йодида пропидия (Sigma-Aldrich, США), 100 мкг/мл РНК-аза (Биолот, Россия) в течение 15 минут при 37°C. Анализ проводили с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Полученные результаты обрабатывали в программе ModFit LT 4.1 (Verity Software House) [4, 5]. Для определения митотической активности клетки фиксировали 70% этанолом (24 ч, -20°C). Затем окрашивали bisBenzimide H 33342 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 минут и проводили подсчет числа митотических клеток с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия), анализировали не менее 500 клеток [4, 5]. Анализ внутриклеточного содержания белков Bax и Bcl-2 проводили с помощью моноклональных антител Alexa Fluor 488 anti-Bax и Alexa Fluor 647 anti-Bcl-2 (Biolegend, США) с использованием проточного цитометра Accuri C6.

Результаты. Показано, что у первичных CD33+ клеток, выделенных из аспирата костного мозга пациентов с диагностированным острым миеломонобластным лейкозом, в составе трехмерных многоклеточных агрегатов происходило повышение устойчивости к действию гидрохлорида доксорубицина, гидрохлорида эпирубицина и гидрохлорида идарубицина относительно тех же клеток, культивируемых в виде одиночной суспензии. Так, при культивировании CD33+ клеток в виде суспензии одиночных клеток величина IC50 (концентрация полумаксимального ингибирования) для гидрохлорида доксорубицина составляла 0,09±0,01 мкМ, гидрохлорида эпирубицина - 0,4±0,1 мкМ и гидрохлорида идарубицина - 0,081±0,004 мкМ. В свою очередь, при культивировании CD33+ клеток в составе многоклеточных трехмерных агрегатов величина IC50 (концентрация полумаксимального ингибирования) для гидрохлорида доксорубицина составляла 1,1±0,3мкМ, гидрохлорида эпирубицина – 1,3±0,2 мкМ и гидрохлорида идарубицина – 3,6±0,7 мкМ. Далее было обнаружено, что ферментативная активность каспазы-3, активация которой является одним из основных событий запуска апоптотического сигнального пути, индуцированного действием антрациклинов [9], которую оценивали по накоплению флуорогенного AMC, после 4 ч инкубации с 1 мкМ гидрохлорида доксорубицина, гидрохлорида эпирубицина или гидрохлорида идарубицина в CD33+ клетках, культивируемых в составе трехмерного многоклеточного агрегата, была значительно ниже по сравнению с одиночными CD33+ клетками. Дополнительно, при изучении экстернализации фосфотидилсерина на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны - маркера апоптотических клеток [10], которую оценивали по числу Annexin V положительных клеток, было выявлено, что в многоклеточных агрегатах CD33+ клеток после 8 ч инкубации с 1 мкМ гидрохлорида доксорубицина, гидрохлорида эпирубицина или гидрохлорида идарубицина число клеток,

содержащих во внешней плазматической мембране фосфотидилсерин, было значительно ниже по сравнению с CD33+ клетками, культивируемыми в виде суспензии одиночных клеток.

Повышение лекарственной устойчивости в многоклеточных трехмерных культурах может быть связано со снижением пролиферативной активности и/или переходом опухолевых клеток в состояние пролиферативного покоя G_0 [11]. Показано, что число клеток в составе многоклеточных трехмерных агрегатов увеличивается с 45±3 до 69±6 % в G_0/G_1-фазе, уменьшалось с 41±5 до 18±3 % в S-фазе и не изменялось в фазах G_2/M и M относительно клеток, культивируемых в виде суспензии одиночных клеток. Далее было обнаружено, что 54±7 % CD33+ клеток в многоклеточных агрегатах и 51±9 % CD33+ клеток, культивируемых в виде суспензии одиночных клеток, содержат ядерный антиген Ki-67, экспрессия которого характерна для клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла (G_1-, S-, G_2- и M-фазы) [12].

Известно, что изменение содержания антиапоптотических и проапоптотических белков может защищать клетки ОММЛ от индукции клеточной гибели [13]. Выявлено, что у клеток в составе трехмерных многоклеточных агрегатов увеличивается содержание антиапоптотического белка Bcl-2 и не изменяется содержание проапоптотического белка Bax по сравнению с одиночными клетками. Дополнительно было обнаружено, что у CD33+ клеток в составе трехмерных многоклеточных агрегатах соотношение Bax/Bcl-2 составляло 0,68±0,05, а, в свою очередь, у CD33+ клеток, культивируемых в виде суспензии одиночных клеток, – 1,3±0,2. Предполагается, что соотношение Bax/Bcl-2, или индекс выживаемости клетки, может быть одним из основных факторов, определяющих восприимчивость клетки к апоптозу [14].

Заключение. В представленной работе показано повышение устойчивости первичных CD33+ клеток острого миеломонобластного лейкоза к цитотоксическому действию антрациклинов в трехмерных многоклеточных агрегатах, которое сопровождалось подавлением проапоптотического сигнального пути, частичным накоплением клеток в G_0/G_1-фазе клеточного цикла и увеличением содержания антиапоптотического белка Bcl-2. Полученные результаты указывают на то, что лекарственная устойчивость лейкозных клеток может быть опосредована не только контактами с стромальными клетками костного мозга и стромальной гуморальной регуляцией, но и собственно лейкозными клетки, в условиях формирования многоклеточных трехмерных структур.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00223-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shimony S., Stahl M., Stone R.M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 2023, 98: 502-526.
2. Kantarjian H., Borthakur G., Daver N., DiNardo C.D., Issa G., Jabbour E., Kadia T., Sasaki K., Short N.J., Yilmaz M., Ravandi F. 2024. Current status and research directions in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **14**, 163.
3. Culver-Cochran A.E., Hassan A., Hueneman K., Choi K., Ma A., VanCauwenbergh B., O'Brien E., Wunderlich M., Perentesis J.P., Starczynowski D.T. Chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia is mediated by A20 suppression of spontaneous necroptosis. *Nat. Commun.* 2024, 15: 9189.
4. Kobyakova M., Lomovskaya Y., Senotov A., Lomovsky A., Minaychev V., Fadeeva I., Shtatnova D., Krasnov K., Zvyagina A., Odinokova I., Akatov V., Fadeev R. The increase in the drug resistance of acute myeloid leukemia THP-1 cells in high-density cell culture is associated with inflammatory-like activation and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23: 7881.
5. Kobyakova M., Lomovskaya Y., Senotov A., Lomovsky A., Minaichev V., Zvyagina A., Solovieva M., Fadeeva I., Akatov V., Fadeev R. Appearance of signs of differentiation and pro-inflammatory phenotype in acute myeloid leukemia cells THP-1 with an increase in their TRAIL resistance in cell aggregates in vitro. *Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A.* 2021, 15: 97-105.
6. Azharuddin M., Roberg K., Dhara A.K., Jain M.V., Darcy P., Hinkula J., Slater N.K.H., Patra H.K. Dissecting multi drug resistance in head and neck cancer cells using multicellular tumor spheroids. *Sci. Rep.* 2019, **9**: 20066.
7. Sayo K., Aoki S., Kojima N. Fabrication of bone marrow-like tissue in vitro from dispersed-state bone marrow cells. *Regen. Ther.* 2016, 3: 32-37.
8. Kobyakova M., Senotov A., Krasnov K., Lomovskaya Y., Odinokova I., Kolotova A., Ermakov A., Zvyagina A., Fadeeva I., Fetisova E., Akatov V., Fadeev R. Pro-inflammatory activation suppresses TRAIL-induced apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 2024, 89:431-440.
9. Ueno M., Kakinuma Y., Yuhki K., Murakoshi N., Iemitsu M., Miyauchi T., Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J. Pharmacol. Sci.* 2006, 101: 151-158.
10. Gomes M.T., Palasiewicz K., Gadiyar V., Lahey K., Calianese D., Birge R.B., Ucker D.S. Phosphatidylserine externalization by apoptotic cells is dispensable for specific recognition leading to innate apoptotic immune responses. *J. Biol. Chem.* 2022, 298: 102034.
11. Nowacka M., Sterzynska K., Andrzejewska M., Nowicki M., Januchowski R. Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 138: 111536.
12. Duchrow M., Schlüter C., Key G., Kubbutat M.H., Wohlenberg C., Flad H.D., Gerdes J. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1995, 43: 117-121.

13. Srivastava R.K., Sasaki C.Y., Hardwick J.M., Longo D.L. Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J. Exp. Med.* 1999, 190: 253-265.
14. Raisova M., Hossini A.M., Eberle J., Riebeling C., Wieder T., Sturm I., Daniel P.T., Orfanos C.E., Geilen C.C. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 2001, 117: 333-340.

НОВЫЙ МАРКЕР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ – KCNB2

Лалетин В.А., Ткачук В.А., Чечехин В.И.

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины медицинского научно-образовательного института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Жировая ткань – это не просто энергетическое депо организма, но и активный эндокринный орган, играющий ключевую роль в регуляции метаболизма, иммунного ответа и гомеостаза [1]. Нарушение обновления жировой ткани приводит к развитию ряда заболеваний, например, ожирения, сахарного диабета 2 типа, липодистрофии, инсулинорезистентности и ряда других [2,3]. За обновление жировой ткани отвечают стволовые клетки (*ADSC – Adipose-derived stem cells*). Однако маркеры, имеющиеся на сегодняшний день, не позволяют точно определять и выделять популяции стволовых клеток жировой ткани. В данной работе мы поставили задачу составить атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека, используя несколько датасетов от различных исследовательских групп. На основе созданного атласа мы планируем найти специфический маркер для стволовых клеток.

Материалы и методы. Данные секвенирования одиночных клеток подкожной жировой ткани человека были взяты из баз данных GEO и GSA: GSE155960, GSE156110, HRA000901, GSE128889). Выравнивание Fastq-файлов на референсный геном (GRCh38-Ensambl98) осуществляли с помощью cellranger 7.0.0 [4]. Качественный контроль провели с помощью пакетов SoupX - удаление фоновой (внеклеточной) мРНК-контаминации (1.6.2), scDblFinder – метод для обнаружения дублетов и их удаления (1.16.0) и Scanpy - анализ данных об экспрессии генов в отдельных клетках (версия) [5,6]. Полученные датасеты интегрировали с помощью пакетов таких методов как harmony (0.1.8), bbknn (1.6.0), scanorama (1.7.4), scvi, scanvi (1.1.2), seurat (5.0.1) [7-12]. Лучший метод интеграции был определен с помощью пакета scib (1.1.5) [13]. Поиск маркерных генов осуществляли с помощью пакета Scanpy методом Wilcoxon. Оценку активности транскрипционных факторов осуществляли с помощью базы данных CollecTri и одномерной линейной модели в пакете decoupler (1.8.0) [14,15].

Результаты. С помощью доступных датасетов РНК секвенирования одиночных клеток мы создали атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека. В атласе мы обнаружили преадипоциты, стволовые клетки жировой ткани, эндотелиальные,

муральные и различные типы иммунных клеток. Преадипоциты были определены с помощью маркеров - *CXCL14, BMPER, ABCA10, ABCA6*; стволовые клетки - *SCARA5, CD55, DPP4*; остальные клеточные популяции были определены с помощью специфических маркеров (табл. 1). В результате мы получили общий атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека (рис. 1).

Табл. 1. Клеточные популяции и маркеры, с помощью которых проводилась их аннотация.

Тип клеток	Список маркеров клеток
Стволовые клетки (ASDC)	*DPP4, SCARA5, CD55, BMP7*
Преадипоциты (Preadipocyte)	*BMPER, CXCL14, ABCA10*
Т клетки (T)	*CD2, CD3EG, CD3D, CD3E*
Натуральные киллеры (NK)	*NKG7, KLRF1, KLRC2, GNLY*
Врожденные лимфоидные клетки (ILC)	*TNFRSF18, KIT, TNFSF11*
Пролиферирующие T/NK клетки (prolif T/NK)	*CD3E, NKG7, MKI67, TOP2A*
B клетки (B)	*CD79A, MS4A1, GNG7*
Муральные клетки (Mural)	*ACTA2, MYLK, MYO1B*
Эндотелиальные клетки (Endothelial)	*PECAM1, KDR, CDH5, ENG*
Дендритные клетки (DC)	*CLEC10A, CLEC9A, FCER1A*
Моноциты-Макрофаги-Нейтрофилы (Mono-Mf-Neu)	*CSF1R, CD68, CD14, CD163, S100A8, S100A12*

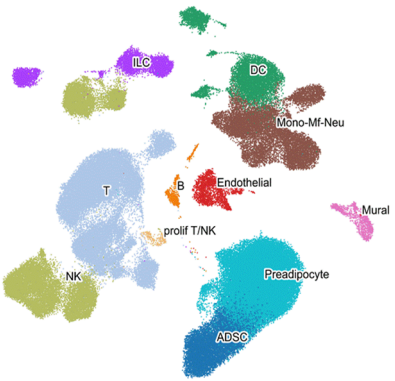


Рис. 1. Атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека.

Для подтверждения стволового статуса *ADSC* был проведен анализ активности транскрипционных факторов стволовости и регуляторов адипогенеза. Из общего атласа клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека мы вырезали фрагмент, включающий в себя только клетки преадипоцитов и стволовых клеток. В результате мы показали, что активность транскрипционных факторов связанных со стволовостью (*HES1, TBX3, GATA6*) выше в *ADSC* по сравнению с популяцией преадипоцитов (рис. 2) [16-18].

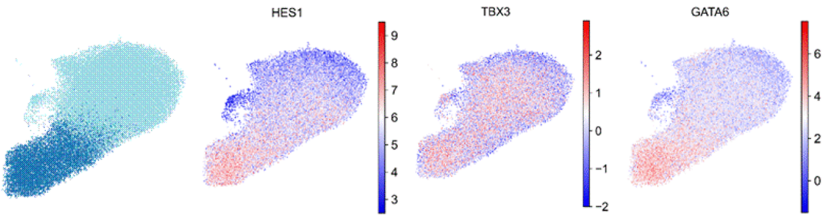


Рис. 2. Активность транскрипционных факторов, поддерживающих стволовость (синий – ADSC, голубой – Preadipocyte).

При этом активность транскрипционных факторов, связанных с адипогенной дифференцировкой (*ASCL1, FOXO1, CEPBA*) была ниже в *ADSC*, чем в преадипацитах. (рис. 3). Таким образом мы подтвердили, что в *ADSC* активированы транскрипционные факторы стволовости и ингибированы факторы адипогенеза [19-21].

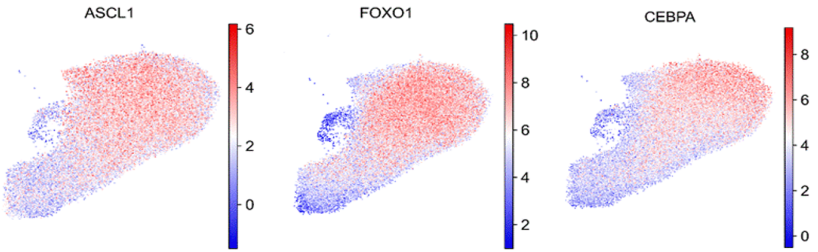


Рис. 3. Активность транскрипционных факторов регуляторов адипогенеза.

Далее мы осуществили поиск маркерных генов в полученном атласе для стволовых клеток жировой ткани. Мы использовали статистический тест Вилкоксона и определение доли клеток, экспрессирующих гены в стволовых клетках жировой ткани и всех остальных клеток атласа. С помощью данного метода мы обнаружили, что только *KCNB2* экспрессировался исключительно в стволовых клетках жировой ткани. При этом *DPP4* и другие общепринятые маркеры стволовых клеток жировой ткани экспрессировались и в других клетках (рис. 4).

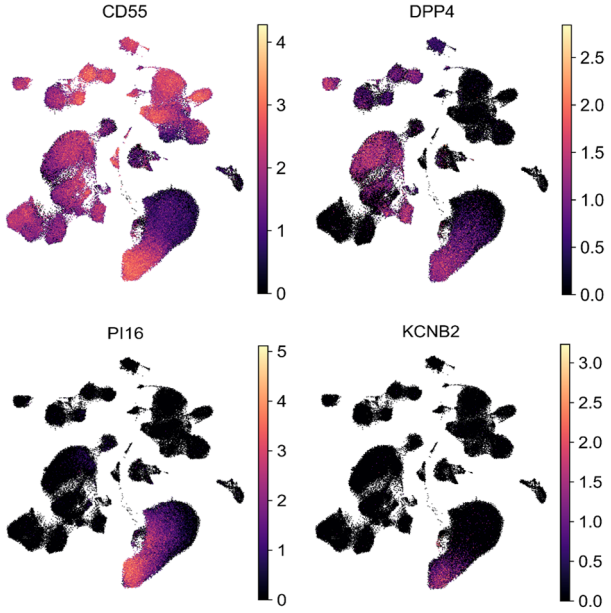


Рис. 4. Экспрессия «классических» маркеров *ADSC* (*PI16, CD55, DPP4*) и *KCNB2* в различных популяциях клеток жировой ткани.

Полученные результаты указывают на то, что маркер *KCNB2* является специфическим для стволовых клеток жировой ткани. Этот маркер позволит селективно выделить эту популяцию клеток для таргетного изучения. Результаты биоинформатического анализа, полученные нами, требуют дальнейшей проверки другими методами.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-75-30007.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barthelemy J., Bogard G., Wolowczuk I. Beyond energy balance regulation: The underestimated role of adipose tissues in host defense against pathogens // Frontiers in Immunology. 2023. № March(14). С. 1-17. DOI:10.3389/fimmu.2023.1083191.
2. Semnani-Azad Z., Connelly P.W., Bazinet R.P., Retnakaran R., Jenkins D.J.A., Harris S.B., Zinman B., Hanley A.J. Adipose tissue insulin resistance is longitudinally associated with adipose tissue dysfunction, circulating lipids, and dysglycemia: The promise cohort // Diabetes Care. 2021. № 7(44). С. 1682-1691. DOI:10.2337/DC20-1918.
3. Blüher M. Understanding Adipose Tissue Dysfunction // Journal of Obesity and Metabolic Syndrome. 2024. № 4(33). С. 275–288. DOI:10.7570/jomes24013.
4. Zheng G.X.Y., Terry J.M., Belgrader P., Ryvkin P., Bent Z.W., Wilson R., Ziraldo S.B., Wheeler T.D., McDermott G.P., Zhu J., Gregory M.T., Shuga J., Montesclaros L., Underwood J.G., Masquelier D.A., Nishimura S.Y., Schnall-Levin M., Wyatt P.W., Hindson C.M., Bharadwaj R., Wong A., Ness K.D., Beppu L.W., Deeg H.J., McFarland C., Loeb K.R., Valente W.J., Ericson N.G., Stevens E.A., Radich J.P., Mikkelsen T.S., Hindson B.J., Bielas J.H. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells // Nature Communications. 2017. (8). DOI:10.1038/ncomms14049.
5. Sultana S., Sarker S.A., Brüssow H. What happened to Koch's postulates in diarrhoea? // Environmental Microbiology. 2017. № 8(19). С. 2926–2934. DOI:10.1111/1462-2920.13787.
6. Germain P.L., Robinson M.D., Lun A., Garcia Meixide C., Macnair W. Doublet identification in single-cell sequencing data using scDblFinder // F1000Research. 2022. (10). С. 1–26. DOI:10.12688/f1000research.73600.2.
7. Stuart T., Butler A., Hoffman P., Hafemeister C., Papalexi E., Mauck W.M., Hao Y., Stoeckius M., Smibert P., Satija R. Comprehensive Integration of Single-Cell Data // Cell. 2019. № 7(177). С. 1888-1902.e21. DOI:10.1016/j.cell.2019.05.031.
8. Nowotschin S., Setty M., Kuo Y.Y., Liu V., Garg V., Sharma R., Simon C.S., Saiz N., Gardner R., Boutet S.C., Church D.M., Hoodless P.A., Hadjantonakis A.K., Pe'er D. The emergent landscape of the mouse gut endoderm at single-cell resolution // Nature. 2019. № 7756(569). С. 361–367. DOI:10.1038/s41586-019-1127-1.
9. Description D., Method B. Supplementary Methods Detailed Description of the BBKNN MethodC. 1-18.
10. Hie B., Bryson B., Berger B. Panoramic stitching of heterogeneous single-cell transcriptomic data // bioRxiv. 2018. DOI:10.1101/371179.
11. Lopez R., Regier J., Cole M.B., Jordan M.I., Yosef N. Deep generative modeling for single-cell transcriptomics // Nature Methods. 2018. № 12(15). С. 1053-1058. DOI:10.1038/s41592-018-0229-2.
12. Xu C., Lopez R., Mehlman E., Regier J., Jordan M.I., Yosef N. Probabilistic harmonization and annotation of single-cell transcriptomics data with deep generative models // Molecular Systems Biology. 2021. № 1(17). DOI:10.15252/msb.20209620.
13. Luecken M.D., Büttner M., Chaichoompu K., Danese A., Interlandi M., Mueller M.F., Strobl D.C., Zappia L., Dugas M., Colomé-Tatché M., Theis F.J. Benchmarking atlas-level data integration in single-cell genomics // Nature Methods. 2022. № 1(19). С. 41–50. DOI:10.1038/s41592-021-01336-8.

14. Badia-I-Mompel P., Vélez Santiago J., Braunger J., Geiss C., Dimitrov D., Müller-Dott S., Taus P., Dugourd A., Holland C.H., Ramirez Flores R.O., Saez-Rodriguez J. decoupleR: ensemble of computational methods to infer biological activities from omics data // Bioinformatics Advances. 2022. № 1(2). С. 1-3. DOI:10.1093/bioadv/vbac016.
15. Sophia Müller-Dott 1 ,† , Eirini Tsirvouli 2 , 3 ,† M.V., 4 ,† , Ricardo O. Ramirez Flores Pau Badia-i-Mompel 1 , Robin Fallegger 1 , Dénes Türei 1 , Astrid Lægreid 2 , * A., Saez-Rodriguez J. Expanding the co v er ag e of regulons from high-confidence prior kno wledg e f or accur at e estimation of tr anscription factor activities // Nucleic Acids Research. 2023. № October. С. 1–16.
16. Ma Z., Xu J., Wu L., Wang J., Lin Q., Chowdhury F.A., Mazumder M.H.H., Hu G., Li X., Du W. Hes1 deficiency causes hematopoietic stem cell exhaustion // Stem Cells. 2020. № 6(38). С. 756–768. DOI:10.1002/stem.3169.
17. Klingenstein M., Raab S., Achberger K., Kleger A., Liebau S., Linta L. TBX3 Knockdown Decreases Reprogramming Efficiency of Human Cells // Stem Cells International. 2016. (2016). DOI:10.1155/2016/6759343.
18. Fisher J.B., Pulakanti K., Rao S., Duncan S.A. GATA6 is essential for endoderm formation from human pluripotent stem cells // Biology Open. 2017. № 7(6). С. 1084–1095. DOI:10.1242/bio.026120.
19. Kim E.J., Leung C.T., Reed R.R., Johnson J.E. In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis // Journal of Neuroscience. 2007. № 47(27). С. 12764–12774. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3178-07.2007.
20. Egorov A.D., Penkov D.N., Tkachuk V.A. Molecular and cellular mechanisms of adipogenesis // Diabetes Mellitus. 2015. № 2(18). С. 12–19. DOI:10.14341/DM2015212-19.
21. Greco A., Vaipan D. V., Tkachuk V.A., Penkov D.N. The Involvement of Cardiomyocyte-Specific Transcription Factors Meis in Adipocyte Differentiation // Molekuliarnaia biologiia. 2019. № 3(53). С. 497–501. DOI:10.1134/S0026898419030078.

УСТОЙЧИВОСТЬ МАКРОФАГОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ОМЛ К КВИЗАРТИНИБУ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОДАВЛЕНИЕМ ГЕНА FLT3 И СНИЖЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА FLT3

Ломовская Я.В.[1], Кобякова М.И.[1,2], Краснов К.С.[1], Ломовский А.И.[1], Мещерякова Е.И.[1], Фадеев Р.С.[1]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
[2]Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является одной из самых агрессивных форм острого лейкоза у взрослых [1]. На сегодняшний день в клинике одобрено применение квизартиниба (AC220) – высокоселективного ингибитора FLT3 (fms-подобной тирозинкиназы 3). Он обладает высокой эффективностью в отношении лейкозных клеток с мутацией FLT3-ITD (внутритандемная дупликация), для которых характерна конститутивная активация FLT3-сигнального пути и нижележащих сигнальных каскадов MAPK/ERK, PI3K/AKT и STAT5, опосредующих пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [2]. В тоже время цитостатический эффект квизартиниба, но в более высоких концентрациях показан также для лейкозных клеток с отсутствием мутаций в FLT3 (дикий тип FLT3-WT) [3]. Однако развитие первичных и вторичных механизмов резистентности у лейкозных клеток к действию квизартиниба представляет собой существенное препятствие для терапии лейкозов и требует дальнейшего изучения.

Ранее в нашей лаборатории в условиях воспалительного гиперклеточного микроокружения - высокоплотной культуре лейкозных клеток линии THP-1 были получены макрофагоподобных клетки ОМЛ (THP-1ad), устойчивые к эффектору противоопухолевого иммунитета цитокину TRAIL [4]. Биоинформатический анализ транскриптома показал, что наиболее подавленным геном у данных клеток является FLT3 [5]. Исходя из этого было выдвинуто предположение о формировании механизма устойчивости у макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к действию квизартиниба, опосредованного снижением экспрессии гена FLT3.

Материалы и методы. Клетки острого миелоидного лейкоза человека THP-1 (TIB-202) (FLT3-WT) получены из ATCC (США). Пролиферирующие макрофагоподобные клоны THP-1ad получены как указано ранее [4]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma) при 37°C и 5% CO_2 в воздухе. Анализ цитотоксичности квизартиниба оценивали после 24 ч инкубации по восстановлению резазурина, используя планшетный спектрофлуориметр Infinity F200. Анализ экспрессии рецепторов FLT3 проводили с использованием моноклональных антител APC anti-human FLT3 (CD135), APC Mouse IgG1, к Isotype Ctrl (Sony Biotechnology, Япония). Для исследования активации сигнальных путей в макрофагоподобных клонах THP-1ad в сравнении с родительскими клетками THP-1 использовали анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA). В работе анализировали наборы генов из коллекций Reactome (https://reactome.org/) базы данных молекулярных сигнатур MSigDB (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/collections.jsp) с использованием пакета программ для языка программирования Python (вер. 3.10) GSEApy (вер. 1.0.5). В качестве критерия активации сигнального пути использовали значение показателя обогащения. Результаты представляли в виде среднего ± стандартное отклонение (M±SD). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Статистическую значимость различий определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, $p < 0.05$. Статистическую значимость изменений экспрессии генов оценивали с применением теста Вальда с поправкой на множественное сравнение Беньямини–Хохберга (FDR) ≤ 0.05.

Результаты и обсуждение.

Макрофагоподобные клетки ОМЛ THP-1ad обладают повышенной устойчивостью к цитотоксическому действию квизартиниба в сравнение с клетками THP-1. Анализ цитотоксического действия квизартиниба показал, что макрофагоподобные клетки THP-1ad обладают повышенной устойчивостью к цитотоксическому действию квизартиниба в сравнении с недифференцированными клетками THP-1. Было установлено, что количество абсолютно нечувствительных к квизартинибу клеток THP-1ad составляло 80±5%. Это указывает на повышение резистентности к квизартинибу популяции клеток THP-1ad в сравнении с THP-1 (Рис. 1).

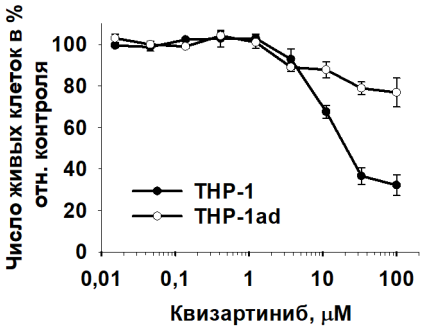


Рис. 1. Цитотоксическое действие квизартиниба на клетки THP-1ad и THP-1. По оси ординат – число живых клеток в процентах, относительно контроля (необработанных клеток) через 24 часа после добавления квизартиниба. Данные приведены в виде среднего значения ± SD, (n≥5).

В клетках THP-1ad обнаружено подавление экспрессии гена FLT3 при сохранении активности FLT3-сигнального пути. Ранее идентификация дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в клетках THP-1ad показала, что среди генов с пониженной экспрессией наиболее подавленным является FLT3, log2(КИ) = -5.82 ± 0.17 (снижение в 56 раз) [5]. Продуктом этого гена является рецепторная тирозинкиназа (CD135), которая связывает на мембране клеток цитокин FLTLG и регулирует дифференцировку, пролиферацию и выживание гемопоэтических клеток-предшественников и дендритных клеток. Известно, что экспрессия FLT3 характерна для незрелых гемопоэтических клеток, а снижение выраженности этого рецептора наблюдается в том числе при дифференцировке клеток миелоидного ряда.

Для изучения активности генов – партнеров FLT3 далее было произведено построение сети белок-белковых взаимодействий молекулярных партнеров с геном рецептора FLT3, изображение которых представлено на рис. 2А. Всего среди взаимодействующих с FLT3 метаболитов обнаружено 10 генов. Эти молекулярные партнеры FLT3 – ДЭГ, значение Log2(КИ) которых, для повышенной и пониженной экспрессии не превышает 1 и -1, соответственно. Таким образом, для представленных генов-партнеров FLT3 показано отсутствие выраженных отличий в экспрессии для клеток THP-1ad относительно клеток THP-1. Выраженное подавление в транскрипции имеет только ген FLT3.

На основе полученных результатов, в частности на основании значительного снижения экспрессии FLT3 и ряда генов-соседей было выдвинуто предположение о снижении активации сигнального пути, ассоциированного с рецептором FLT3. Для изучения активности FLT3-сигнального пути был проведен анализ обогащения по функциональной

принадлежности (GSEA) базы данных MSigDB на всем наборе данных секвенирования транскриптома. Данный анализ позволяет оценить повышение или подавление активности исследуемого сигнального пути, а также всех изучаемых генов-мишеней за счет учета даже незначительных изменений транскрипционной активности. Полученные результаты обогащения наборов генов представлены на рис. 2Б.

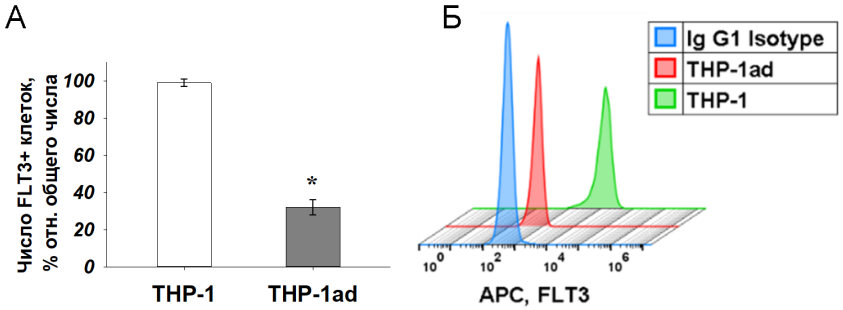


Рис. 3. А – сеть белок-белковых взаимодействий молекулярных партнеров гена FLT3 в клетках THP-1ad. Зеленого цвета –продукты генов с повышенной, а желтого и красного – с пониженной экспрессией. Б – Анализ обогащения набора генов FLT3-сигнального пути в клетках THP-1ad относительно клеток THP-1. Показатель ложно положительных результатов (FDR) ≤ 0.05

Верхняя часть графика показывает степень обогащения набора генов смещением в левую или правую часть и увеличением или уменьшением показателя обогащения. В данном случае GSEA показал, что в клетках THP-1ad сигнальный путь FLT3, на основе значения положительного показателя обогащения равного 0.43, достоверно (FDR ≤ 0.05) более выражен, чем в интактных клетках THP-1, что может указывать на возможное сохранение функциональной активности этого сигнального пути, не смотря на сильное снижение экспрессии гена рецептора в макрофагоподобных клетках THP-1ad.

Таким образом биоинформатический анализ транскриптома макрофагоподобных клеток THP-1ad в сравнении с клетками THP-1 показал только выраженное подавление транскрипции гена FLT3 у клеток THP-1ad на фоне обогащения FLT3-сигнального пути.

Для макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad характерно снижение экспрессии рецептора FLT3 в сравнение с клетками THP-1. Было выявлено, что у макрофагоподобных клеток THP-1ad снижается количество клеток в популяции, несущих FLT3, относительно общего числа клеток (рис. 3А,Б). Так только 32±4% клеток в популяции THP-1ad несут FLT3, у контрольных клеток THP-1 вся популяции несёт FLT3 рецептор (рис. 3А).

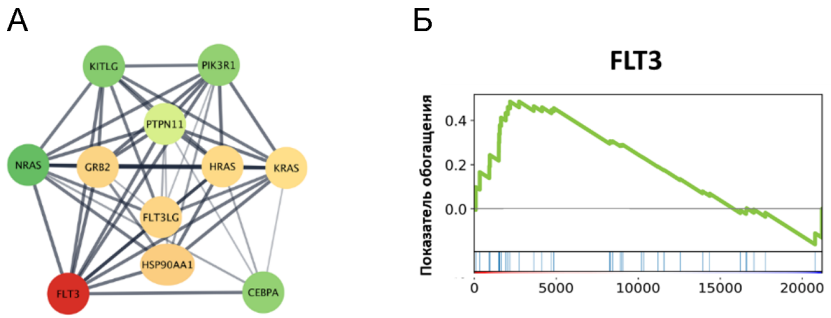


Рис. 3. Анализ экспрессии рецептора FLT3 в популяции клеток THP-1ad относительно родительских клеток THP-1ad. Б – Гистограммы экспрессии рецептора FLT3 на поверхности клеток THP-1ad и THP-1. Ig G1 Isotype – контроль изотипа антитела. Данные приведены в виде среднего значения ± SD ($n \geq 5$). * – $p < 0.05$ в сравнении с клетками THP-1.

Таким образом, формирование устойчивости к квизартинибу у макрофагоподобных клеток THP-1ad формируется при снижении экспрессии рецептора FLT3

Заключение. Полученные результаты показали, что макрофагоподобные TRAIL-резистентные клетки ОМЛ THP-1ad, могут приобретать устойчивость к таргетному препарату – квизартинибу. В основе механизма формирования данной устойчивости у клеток THP-1ad может лежать снижение экспрессии рецептора FLT3, ассоциированное с сильным подавлением активности гена FLT3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turkalj S, Radtke FA, Vyas P. An Overview of Targeted Therapies in Acute Myeloid Leukemia. *Hemasphere.* 2023;7,E914.
2. Cortes J. Quizartinib: a potent and selective FLT3 inhibitor for the treatment of patients with FLT3-ITD–positive AML. *J Hematol Oncol*. 2024;17, 111.
3. Nepomuceno R, Rooks AM, Gardner M, Armstrong R. Differential Inhibition of FLT3-ITD, FLT3-WT, and KIT By Quizartinib As Assessed By Modified PIA Assay. *Blood*. 2014;124 (21): 951.
4. Lomovskaya YV, Kobyakova MI, Senotov AS. et al. Macrophage-like THP-1 Cells Derived from High-Density Cell Culture Are Resistant to TRAIL-Induced Cell Death via Down-Regulation of Death-Receptors DR4 and DR5. *Biomolecules.* 2022; 12,150.
5. Ломовская ЯВ, Краснов КС, Кобякова МИ, и др. Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза. *Acta Naturae*. 2024;16(1):48-58.

УЧАСТИЕ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ В СИНХРОНИЗАЦИИ ОТВЕТА КУЛЬТУРЫ МСК НА ПТГ

Смажило К.Ю., Усачёв В.А., Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю.

Факультет фундаментальной медицины МНОИ
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Отличительной чертой костной ткани является ее непрерывное обновление и способность к регенерации на протяжении всей жизни организма. Данный механизм обуславливается строгим соблюдением баланса между процессами формирования и резорбции кости. Ключевую роль в координации данных процессов играет межклеточное взаимодействие, осуществляемое через эндокринные и паракринные сигналы. Сбой в функционировании этой системы вызывает нарушение работы ткани, что способствует развитию заболеваний опорно-двигательной системы. Одним из главных гормнов-регуляторов костного метаболизма является паратиреоидной гормон (ПТГ). Его уникальная способность влиять на все типы костных клеток делает его перспективной мишенью для разработки лекарственных средств [1]. Однако ПТГ демонстрирует двойственный профиль ответов у пациентов - способствует формированию костной ткани при периодическом введении и резорбции кости при непрерывном введении. До конца молекулярный механизм действия паратгормона неясен и требует дополнительного изучения.

Относительно недавно было установлено, что в костной ткани ПТГ вызывает разные варианты кальциевого ответа в мезенхимных стволовых клетках (МСК): осцилляции, одиночные пики и плавный прирост внутриклеточного кальция [2]. Вариант ответа четко коррелирует с эффектом гормона на остеогенную дифференцировку в различных депо организма. Например, в надкостнице, где преобладающий вариант ответа представлен осцилляциями и одиночными пиками, ПТГ оказывает антиостеогенный эффект. А в подкожной жировой клетчатке, где большая часть клеток отвечает плавным приростом кальция, - проостеогенное. Данный феномен связан с тем, что рецептор ПТГ способен связывать два G-белка на поверхности клеток и одновременно активировать одну из двух сигнальных системы – аденилатциклазную или фосфолипазную. При этом данные системы находятся в динамическом равновесии, поэтому ингибирование одной из них позволяет переключать преимущественный тип - ответ в тканях, тем самым изменяя эффект ПТГ на дифференцировку в остеогенном направлении. Самым интересным является то, что это

действие реализуется на популяции целиком несмотря на то, что лишь небольшой процент клеток отвечает на ПТГ.

Исходя из базовых знаний устройства культуры МСК, мы предполагаем, что в данном случае имеет место быть механизм «синхронизации ответа», обусловленный продукцией паракринных факторов. Для подтверждения или опровержения данного утверждения, было решено провести эксперимент в условиях неконтактного сокультивирования с использованием системы Transwell, по итогам которого можно будет сделать вывод относительно возможности модулирования извне остеогенеза посредством использования среды, обогащенной ключевыми паракринными факторами, способствующими остеогенезу.

Материалы и методы. Исследование проводилось на культуре МСК жировой ткани здоровых доноров, а также линии иммортализованных МСК человека ASC52telo в условиях неконтактного сокультивирования с использованием системы неконтактного сокультивирования Transwell®. Мы оценивали влияние паратиреоидного гормона на дифференцировочный потенциал МСК в остеогенном направлении. Эффективность дифференцировки определялась с помощью цитохимического окрашивания ализариновым красным и анализа уровня экспрессии генов остеогенеза RunX и остеокальцин при помощи ПЦР в реальном времени. Также была проведена оценка воспроизводимости полученных Transwell® результатов с использованием кондиционированной среды культуры МСК подкожной жировой клетчатки здорового донора.

Результаты. *ПТГ оказывает сходный эффект на остеогенез первичной культуры МСК, выделенной из подкожной жировой клетчатки, как при прямом воздействии, так и в условиях неконтактного сокультивирования.* На фотографиях (рис. 1А и 1Б) заметны отложения гидроксиапатита кальция, как в условиях прямого добавления ПТГ, так и в модели неконтактного сокультивирования, где обрабатывались гормоном только клетки во вставке Transwell. Сокультивирование МСК с клетками, предобработанными ПТГ, воспроизводило проостегонное действие паратиреоидного гормона при его прямом добавлении в остеогенную среду.

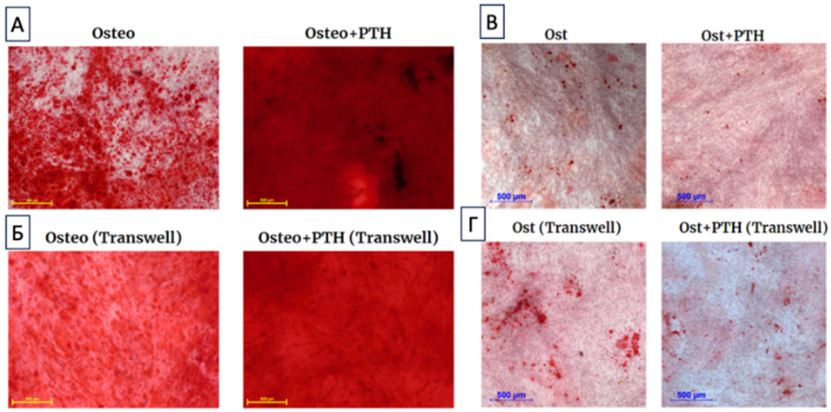


Рис. 1. Результаты окрашивания Ализариновым красным МСК подкожной жировой клетчатки и ASC52Telo. Все образцы клеток культивировались на остеогенной дифференцировочной среде. А и В – фотографии клеток не имеющих в лунках вставок Transwell, без обработки ПТГ (Osteo) и при прямом добавлении гормона (Osteo+PTH). Б и Г – фотографии образцов, имевших в лунках вставки с клетками Transwell, без обработки ПТГ (Osteo (Transwell)) и при добавлении гормона во вставку (Osteo+PTH (Transwell)). Масштабная линейка представляет собой 500 мкм.

ПТГ оказывает сходный эффект на остеогенную дифференцировку ASC52telo как при прямом воздействии, так и в условиях неконтактного сокультивирования. Линия иммортализованных клеток ASC52telo представляет собой стандартизированную культуру мезенхимальных стволовых клеток, которая была получена из клеток жировой ткани донора методом hTERT. В нашем эксперименте мы столкнулись с проблемой вариабельности, связанной с использованием МСК от различных доноров. Она проявлялась в значительных отличиях по пролиферативному потенциалу, способности к дифференцировке и другим функциональным характеристикам клеток, что затрудняло интерпретацию полученных данных и снижало воспроизводимость экспериментов. Чтобы минимизировать влияние донорской вариабельности и повысить стандартизацию эксперимента, мы приняли решение использовать линию клеток ASC52telo.

Для подтверждения наличия остеогенной дифференцировки и оценке визуального влияния ПТГ на остеогенез МСК линии ASC52telo,

клетки окрашивались ализариновым красным на 14 день дифференцировки (рис. 1В и 1Г). Включения гидроксиапатита кальция, как показатели эффективности остеогенной дифференцировки, были обнаружены как в группах прямого добавления ПТГ к клеткам, так и в условиях неконтактного сокультивирования в системе Transwell. Было обнаружено, что, как при прямом добавлении гормона, так и при неконтактном сокультивировании, наблюдается антиостеогенный эффект ПТГ. Результаты, которые мы получили на модельной культуре ASC52telo, отличаются от ранее обнаруженных на первичных культурах МСК подкожной жировой клетчатки. Но данное несоответствие объяснимо, тем что, по литературным данным, иммортализованная культура МСК проявляет схожий фенотип МСК, выделенных из надкостницы [3], а значит, наш эксперимент дублирует полученные итоги исследования в культуре при прямом добавлении ПТГ. Однако, для более детального рассмотрения процесса остеогенеза, мы провели ПЦР-анализ генов-маркеров остеогенной дифференцировки.

На 14 день эксперимента клетки в части лунках подвергались процессу лизирования и дальнейшей ПЦР-обработке на маркеры ранних (Runx2) и поздних (OCN) этапов остеогенеза (рис.2). Несмотря на то, что визуально мы наблюдаем снижение остеогенеза МСК при добавлении ПТГ, относительно экспрессии гена Runx2 между группами нет статистически значимой разницы. Такие результаты могут объясняться тем, что Runx2 действительно важен для стимулирования остеогенеза, однако, после того как запуск данного механизма произошел, его экспрессия снижается, тем самым поддерживая работу ряда функций остеобластов.

Вторым геном для анализа остеогенной дифференцировки был выбран поздний маркер остеогенеза - остеокальцин (рис.2). Относительно экспрессии OCN мы получили результаты, которые говорят о статистически значимом различии между группами, отличающимися по обработке ПТГ. А именно, экспрессия остеокальцина была повышена в группах, которые не были обработаны ПТГ. Полученные данные соответствуют визуальной картине, полученной нами после окраски ализариновым красным: в группах при добавлении ПТГ наблюдается антиостеогенный эффект. При этом модель неконтактного сокультивирования демонстрирует показатели сходные с прямым добавлением гормона к клеткам, тем самым подтверждая, что возможный эффект синхронизации клеток в культуре выполняется посредством паракринных факторов.

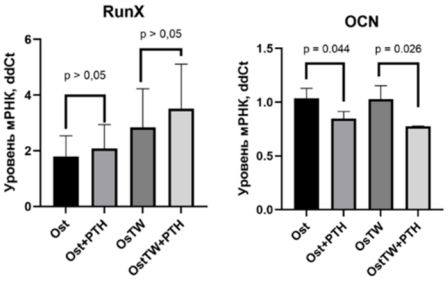


Рис. 2. Экспрессия Runx2 и OCN в линии клеток ASC52telo в условиях прямого и неконтактного сокультивирования при добавлении ПТГ. Клетки, не имеющие в лунках вставок Transwell, обозначаются следующим образом - без обработки ПТГ (Osteo) и при прямом добавлении гормона (Osteo+PTH). Образцы, имеющие в лунках вставки с клетками Transwell, обозначаются - без обработки ПТГ (Osteo (Transwell)) и при добавлении гормона во вставку (Osteo+PTH (Transwell)).

Применение кондиционированной среды приводит к результатам, аналогичным ранее полученным в системе Transwell. Результаты экспериментов в системе Transwell подтверждают нашу гипотезу о «синхронизации» через паракринные факторы, поэтому в дальнейшем мы решили использовать кондиционированную среду МСК или секретом. Секретом мезенхимальных стволовых клеток представляет собой совокупность биологически активных молекул, которые эти клетки выделяют в окружающую среду, включая цитокины, ростовые факторы, экзосомы и другие продукты секреции. Образцы кондиционированной среды были получены из культуры МСК, выделенных из жировой ткани здорового донора. Эти образцы разделили на две группы: в первой (контрольной) группе клетки не подвергались никаким изменениям, тогда как во второй группе клетки обрабатывались ПТГ на протяжении двух суток (рис. 3).

Изменение интенсивности окрашивания полностью соответствует ранее полученным результатам в системе неконтактного сокультивирования Transwell, что подтверждает тот факт, что главную роль в «в синхронизации клеточного ответа» играют именно выделяемые в среду клетками паракринные факторы.

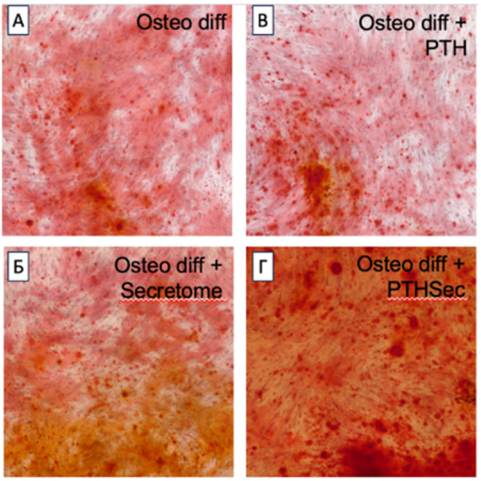


Рис. 3. Результаты окрашивания Ализариновым красным МСК подкожной жировой ткани, культивированных на остеогенной среде: А – без обработки секретомом (Osteo diff), В – с прямым добавлением ПТГ (Osteo diff+PTH), Б – с добавлением кондиционированной среды от необработанных клеток (Osteo diff+Secretome), Г – с кондиционированной средой от клеток, стимулированных ПТГ (Osteo diff+PTHSec). Масштабная линейка представляет собой 500 мкм.

Выводы. В условиях неконтактного сокультивирования эффект ПТГ на остеогенез сопоставим с прямым добавлением гормона к культуре МСК. На МСК подкожной жировой клетчатки он оказывает проостеогенное действие, а на иммортализованные клетки ASC52telo антиостеогенное. Наблюдаемый схожий паттерн ответа клеток свидетельствует о важной роли паракринных механизмов в обеспечении сигнальной активности под воздействием ПТГ. Обнаруженный механизм как при прямом воздействии гормона, так и в условиях неконтактного сокультивирования клеток или при использовании кондиционированной среды МСК после стимуляции, указывает на то, что ключевыми медиаторами ответа являются сигнальные молекулы, секретируемые клетками в окружающую среду. Эти результаты открывают новые перспективы для изучения межклеточной коммуникации и разработок лекарственных препаратов, регулирующих дифференцировку МСК.

Работа выполнена при поддержке гранта программы Научно-образовательных школ МГУ имени М.В. Ломоносова, проект № 23-SCH04-11 (клеточные модели).

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю., Маказан Н.В. и др. Паратиреоидный гормон в регуляции процессов роста и резорбции кости в норме и патологии // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2021. - Т. 76, №5. - С. 506-517.
2. Kulebyakin K, Tyurin-Kuzmin P, Sozaeva L. et al. Dynamic Balance between PTH1R-Dependent Signal Cascades Determines Its Pro- or Anti-Osteogenic Effects on MSC. // Cells. – 2022. – Vol. 11, N.21. – P. 351.
3. Kulebyakin, K., Tyurin-Kuzmin, P., Efimenko, A. et al. Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro. // Frontiers in cell and developmental biology. – 2021. – Vol. 9, N.14. – P. 352.

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ВЫБОРЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Чечехин В.И., Калинина Н.И., Антропова Ю.Г., Ткачук В.А.

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины, медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В основе существования любого живого организма лежат процессы развития и поддержания систем организма в рабочем состоянии. Развитие – это образование системы клеток, организованной в целостный организм, из относительно гомогенного материала. Индивидуальное развитие решает две основные задачи: во-первых, порождает клеточное разнообразие и упорядоченность в пределах отдельного организма; во-вторых, обеспечивает непрерывность жизни из поколения в поколение [1]. Поддержание систем организма в рабочем состоянии решается по-разному в различных группах живых существ. У позвоночных животных ключевыми процессами здесь являются механизмы обновления тканей, а также восстановление после повреждений – регенерация и репарация.

Одним из ключевых вопросов как развития, так и обновления тканей и органов является дифференцировка малодифференцированных клеток в работающие структуры, выполняющие определенную функцию в организме. Для взрослого организма понятие дифференцировки можно определить как возникновение различий между однородными клетками и тканями организма в ходе развития или, более развернуто, как специализация клетки для выполнения тех или иных функций, приобретение ею черт того или иного клеточного типа вследствие включения и выключения определенных генов и возникновения эпигенетических паттернов. Дифференцировка лежит также в основе регенерации тканей и частей тела организма после их повреждения или удаления. В основе процессов обновления и регенерации лежит функционирование стволовой клетки – особого типа клеток, которые сохраняют высокую дифференцировочную и регенеративную способность даже во взрослом организме. Дифференцировка стволовых клеток является основой как индивидуального развития, так и процессов поддержания гомеостаза и обновления тканей взрослого организма. В процессе дифференцировки происходят последовательные эпигенетические и транскрипционные изменения, влияющие на биохимические свойства дифференцирующихся клеток. Как следствие, значительно изменяется функциональная активность клетки, она

приобретает специализированную функцию, соответствующую дифференцированному состоянию. В большинстве случаев дифференцировка носит необратимый характер, хотя в некоторых случаях наблюдается клеточная пластичность, которая проявляется в процессах дедифференцировки и трансдифференцировки [2,3]. Важным моментом является то, что дифференцировка не происходит в условиях изоляции клетки. Напротив, дифференцирующаяся клетка находится в окружении действующих на нее паракринных и гормональных стимулов, а также внеклеточного матрикса. Соответственно, переключение гормональной чувствительности стволовой клетки является важным этапом активации стволовой клетки и выбора ею направления дифференцировки [4,5].

В случае дифференцировки мультипотентных стволовых клеток происходит выбор одной из нескольких программ развития. В таком случае, с одной стороны, требуется активация мастер-регулятора, с другой – подавление активности альтернативных путей дифференцировки. Например, для основных стволовых клеток стромальных тканей, таких как жировая, костная, хрящевая, мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) альтернативными являются адипогенная и миогенная, адипогенная и остеогенная дифференцировки, соответственно [6]. Другие программы дифференцировки, например, хондрогенная и остеогенная, могут запускаться последовательно, поэтому между ними нет антагонизма, но есть последовательность активации соответствующих мастер-регуляторов [3,7]. Механизм функционального антагонизма альтернативных мастер-регуляторов осуществляется либо на уровне взаимного сигнального подавления активности транскрипционных факторов, либо на уровне эпигенетической регуляции. Так, например, альтернативными являются направления миогенной дифференцировки МСК (мастер-регулятор MyoD) и адипогенной дифференцировки (мастер-регулятор PPARγ). При их принудительной одновременной стимуляции в популяции МСК одни клетки превращаются в мышечные, другие – в жировые. Но гибридных клеток, в которых были бы запущены обе программы одновременно, не выявляется. Это связано с тем, что в клетках, в которых запускается адипогенная программа, циклин-зависимые киназы (CDK) вызывают убиквитинилирование и протеасомную деградацию MyoD [6]. В то же время, в клетках, в которых запущена миогенная программа, принудительная экспрессия PPARγ также не приводит к адипогенной дифференцировке. В данном случае это происходит не за счет деградации альтернативного мастер-регулятора, но за счет ингибирования PPARγ-зависимого гиперацетилирования гистонов, происходящего на ранних этапах адипогенной дифференцировки [6]. Таким образом, регуляторные сигнальные молекулы и гормональная чувствительность могут влиять не только непосредственно на сам процесс

коммитирования и дифференцировки стволовых клеток, но и на подавление других направлений специализации для формирования безальтернативности дифференцировочной судьбы стволовой клетки.

В данной работе мы изучали гормональные механизмы активации МСК жировой ткани, а также ее запуска в определенное направление дифференцировки. Для поиска сигнальных механизмов перевода МСК в активированное состояние мы обратились к известным физиологическим механизмам регуляции МСК в ткани. Ключевым регулятором МСК в ткани является симпатическая нервная система и ее нейромедиатор норадреналин [4,8]. Мы проанализировали взаимную локализацию симпатических волокон и МСК в жировой ткани человека. Симпатические волокна мы пометили путем иммунофлуоресцентной окраски на тирозин-гидроксилазу, скорость-лимитирующий фермент синтеза норадреналина. МСК пометили путем окраски на один из их основных маркеров PDGFRβ. МСК непосредственно контактировали с симпатическими волокнами в жировой ткани человека. Дальнейший анализ показал, что обработка МСК норадреналин показала, что этот гормон и нейромедиатор переводил МСК в активированное состояние. Мы предположили, что этот процесс мог быть ассоциирован с изменениями в их гормональной чувствительности.

Поскольку известно, что гормоны могут регулировать чувствительность клеток к самим себе, мы предположили, что норадреналин может влиять на функциональную активность адренергических рецепторов в МСК. Обычно это влияние заключается в том, что действие на клетки гормона вызывает десенситизацию и даун-регуляцию активированных рецепторов, что проявляется в снижении чувствительности и числа отвечающих на гормон клеток [9]. После часовой стимуляции МСК 1 мкМ норадреналина мы протестировали ответ на этот же гормон через 3, 6 и 24 часа. Предварительная стимуляция норадреналином через 6 часов приводила к двукратному увеличению количества МСК, реагирующих на норадреналин Ca^{2+} сигнализацией. При этом эффект был ограниченным по времени. Через 3 или 24 часа МСК реагировали так же, как и необработанные контрольные клетки. Норадреналин транзиторно повышал чувствительность МСК к катехоламинам за счет специфического повышения общего клеточного содержания функционально-активных α1A-адренергических рецепторов и их выхода на поверхность клетки. При этом первичное действие норадреналина воспринималось клетками за счет активации β3-адренорецепторов [10-13]. Таким образом, мы обнаружили уникальный феномен повышения чувствительности клеток к действующему на них гормону. Этот необычный и отложенный во времени сигнальный ответ может быть связан с временным переходом МСК в активированное состояние, при котором на краткое время изменяется гормональная чувствительность и функциональная активность клеток.

В целом, мы показали один из возможных путей активации МСК, которая производилась путем действия на стволовую клетку норадреналина. Последний, вероятно, выделяется из симпатических волокон, непосредственно иннервирующих МСК в ткани. Норадреналин регистрировался β3-адренорецепторами, которые запускали цАМФ-зависимые сигнальные каскады, в результате чего на поверхность клеток выходили α1A-адренорецепторы. β3-адренорецепторы, по-видимому, подвергались десенситизации. Это приводило к изменению чувствительности МСК: на повторное воздействие норадреналина клетки отвечали не β3-адренорецептор/цАМФ-зависимым путем, а α1A-адренорецептор/Ca^{2+}-зависимым образом. При этом чувствительность клеток к норадреналину существенно возрастала. Кроме того, что представляется крайне важным, наблюдаемый сигнальный эффект носил транзиторный характер, что соответствует нашим данным о транзиторности перехода МСК в активированное состояние.

Показанный нами эффект повышения чувствительности клеток к действующему на них норадреналину является уникальным для клеток взрослого организма. В то же время, в эмбриогенезе показан схожий сигнальный феномен переключения бета-адренергической сигнализации [14]. Таким образом, сенситизация МСК к действующим катехоламинам может свидетельствовать о том, что в МСК проявляются регуляторные механизмы, схожие с эмбриональными клетками-предшественниками.

По аналогии с эмбриональными клетками-предшественниками, сигналы, переводящие МСК в инициированное состояние, можно назвать пермиссивными сигналами [1]. Эти сигналы необходимы для направления стволовой клетки в дифференцировку или самообновление, но при этом сами по себе не задают направления выбора судьбы клетки. Они необходимы, но не достаточны для прохождения дифференцировки стволовой клетки. В нашем случае пермиссивным сигналом выступила стимуляция β3-адренорецепторов. Соответственно, после действия пермиссивного сигнала на клетку должен подействовать инструктивный сигнал, который, во-первых, стволовая клетка сможет воспринять только в инициированном состоянии, во-вторых, определит точное направление дифференцировки клетки. Мы проверили, является ли стимуляция вышедших на поверхность клеток α1A-адренорецепторов инструктивным сигналом для одного из направлений дифференцировки МСК.

Стимуляция α1A-адренорецепторов на поверхности активированных МСК привела к усилению их контрактильного фенотипа и дифференцировке части МСК в гладкомышечные клетки. Рассматривая стимуляцию β3-адренорецепторов как пермиссивный сигнал для МСК, который служит для их перевода в инициированное состояние, можно заключить, что стимуляция α1A-адренорецепторов и активируемой ими

кальциевой сигнализации является инструктивным сигналом для направления МСК в контрактильный фенотип. При этом действие на сами α1А-адренорецепторы без предварительной инициации клеток не вызывает подобных эффектов, как мы показали на модели контракции МСК-коллагеновых дисков.

Показанный нами феномен переключения гормональной сигнализации в МСК может лежать в основе развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Механизм такой связи может быть следующим. Ожирение приводит к повышенной продукции лептина с параллельным развитием лептиновой резистентности. Лептин, в свою очередь, повышает активность СНС, которая стимулирует адренергические рецепторы в тканях, в том числе и в жировой. Норадреналин, интенсивно выделяемый гиперактивированной СНС, действует на β3-адренорецепторы на МСК сосудов, вызывая их переход в активированное состояние. При этом на поверхности МСК в несколько раз повышается представленность α1А-адренорецепторов. Последние являются основными вазоконстрикторными адренорецепторами для сосудов жировой ткани. Продолжение повышенной активности СНС приводит к стимуляции α1А-адренорецепторов на сосудах, контракции сосудов, а также к частичной дифференцировке МСК в ГМК, что еще значительнее усиливает контрактильный ответ сосудов. Как итог, развивается артериальная гипертензия, ассоциированная с ожирением.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-75-30007 (https://rscf.ru/project/19-75-30007/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гилберт, С.Ф. and М.Д.Ф. Барреси, Биология развития. 12 ed. Vol. 1. 2022: Лаборатория знаний. 803.
2. Kopp, J.L., M. Grompe, and M. Sander, Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. Nature cell biology, 2016. 18(3): p. 238-245.
3. Tyurin-Kuzmin, P., et al., Metabolic Regulation of Mammalian Stem Cell Differentiation. Biochemistry (Moscow), 2020. 85(3): p. 264-278.
4. Chechekhin, V., et al., Alpha1A-and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension. Cells, 2023. 12(4): p. 585.
5. Kulebyakin, K., et al., Dynamic Balance between PTH1R-Dependent Signal Cascades Determines Its Pro-or Anti-Osteogenic Effects on MSC. Cells, 2022. 11(21): p. 3519.
6. Sunadome, K., et al., Antagonism between the master regulators of differentiation ensures the discreteness and robustness of cell fates. Molecular cell, 2014. 54(3): p. 526-535.

7. Chechekhin, V.I., et al., GPCRs in the regulation of the functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022. 10: p. 953374.
8. Kotova, P.D., et al., Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. Biochim Biophys Acta, 2014. 1843(9): p. 1899-908.
9. Kelly, E., C.P. Bailey, and G. Henderson, Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. Br J Pharmacol, 2008. 153 Suppl 1: p. S379-88.
10. Tyurin-Kuzmin, P.A., et al., Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. Sci Rep, 2016. 6: p. 32835.
11. Tyurin-Kuzmin, P.A., et al., Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. Sci Data, 2018. 5: p. 180196.
12. Tyurin-Kuzmin, P.A., et al., Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line. Int J Mol Sci, 2018. 19(12).
13. Chechekhin, V.I., et al., Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline. MethodsX, 2024. 12: p. 102587.
14. Zeiders, J.L., et al., Ontogeny of cardiac beta-adrenoceptor desensitization mechanisms: agonist treatment enhances receptor/G-protein transduction rather than eliciting uncoupling. J Mol Cell Cardiol, 1999. 31(2): p. 413-23.

МЕТАГЕНОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Федорова М.С.[1], Павлов В.С.[1], Филатова А.А.[2], Калинин Д.В.[2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Рак поджелудочной железы (РПЖ) является одним из самых летальных типов злокачественных новообразований с очень низкой выживаемостью (5-7%), которая связана с сложностью его ранней диагностики [1] и агрессивным течением [2]. Прогрессия и метастазирование РПЖ завязана на множестве аспектов, одним из которых является опухолевой микробиом. Он играет важную роль в формировании микросреды опухоли [3] и модификации сигнализации опухолевого микроокружения и опухолевых клеток [4]. На данный момент, до конца не ясно каким образом подобное комплексное взаимодействие этих компонентов влияет на внутриклеточную сигнализацию клеток поджелудочной железы.

Методы. При помощи набора ExtractDNA FFPE (Evrogen, Россия) выделена тотальная ДНК из FFPE образцов опухолей, прилегающих нормальных тканей, здоровых лимфоузлов, метастазов в лимфоузел, из FFPE контролей. При помощи MULTIPLEX TCR PCR Mix (МайЛаборатори, Россия) выполнена подготовка ампликонных библиотек с специальными мультиплексными праймерами для поднятия коротких последовательностей 5R участка бактериальной рРНК, индексирование производилось специфическими индексами (по 0.2μM каждого праймера. Секвенирование библиотек произведено на приборе MiSeq (Illumina, США) в режиме парно-концевых прочтений (150×2) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles).

Полученные прочтения вычислительно объединены в длинные ампликоны с использованием Short MUltiple Regions Framework (SMURF) и базы данных Greengenes. Чтобы улучшить таксономическое назначение, использовался классификатор рибосомальной базы данных (RDP).

Полученные данные пропустили через серию из 5 фильтров для обнаружения и удаления загрязнения:

Фильтр 1 – удаление видов, которые имеют высокую распространенность в отрицательном контроле;

Фильтры 2-4 – удаление менее распространенных загрязнений (которые могут быть вызваны более редкими случаями заражения, происходящими во время обработки, или перекрестными загрязнениями между образцами). Сравнена распространенность таксонов в образцах с их распространенностью в контроле. Сравнения распространенности таксонов в исследуемых образцах и контрольных образцах проведены для каждого состояния, для каждой партии, образцы сравнивались из одного и того же состояния с контролями, которые обрабатывались вместе с ними: партия выделения ДНК (фильтр 2), партия ПЦР-амплификации (фильтр 3) и партия библиотеки секвенирования (фильтр 4).

Фильтр 5: сравнение распространенности таксонов во всех образцах для каждого состояния с их распространенностью в наборе пустых контрольных парафиновых блоков.

Результаты и обсуждение. При сравнении микробиома опухоли и метастаза обнаружено семейство бактерии, присутствующее только в опухолевой такни – Alcaligenaceae. Семейство бактерий Alcaligenaceae, входящее в состав микробиома кишечника, имеет отношение к целому ряду заболеваний и состояний здоровья. Представители этого семейства, согласно литературным данным, ассоциированы с хронической болезнью почек [5], их присутствие повышает уровень риска рака ротовой полости [6]. Они ассоциируются с такими заболеваниями, как воспалительные заболевания кишечника [7], хронические заболевания почек [5], желчнокаменная болезнь [8], рак щитовидной железы [9], колоректальный рак [10], плоскоклеточная карцинома пищевода [11] и рак молочной железы [12], что указывает на потенциальную роль в развитии или прогрессировании заболевания.

При сравнении микробиома опухоли и метастатического лимфоузла на уровне вида, обнаружена бактерия, которая присутствует только там - Methylobacterium radiotolerans. Сообщалось, что Methylobacterium radiotolerans может стать причиной инфекционного эндокардита [13], инфекции кровотока [14-16]. Показано, что она может влиять на иммунную микросреду опухолей молочной железы [17]. Негативно коррелирует с TNM стадией, уровнем Глисона, уровнем простат-специфического антигена и экспрессией андрогенных рецепторов при раке предстательной железы [18].

Полученные данные говорят нам о том, что, изменяя иммунную среду опухоли, бактериальные метаболиты могут влиять на процессы инвазии и метастазирования. Бактерии или их метаболиты обычно вызывают врожденные реакции иммунных клеток и вызывают их миграцию в опухоль. Микробиота участвует в формировании иммунной толерантной среды путем поляризации макрофагов и характеризуется накоплением провоспалительных факторов, включая метаболические

промежуточные продукты и эффекторы. Цитокины, продуцируемые опухолью, такие как Fas-лиганд, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующий фактор роста-h, могут способствовать подавлению иммунного ответа на опухоль. TNF, эндогенный опухолевый промотор, стимулирует рост раковых клеток, их пролиферацию, инвазию и метастазирование, а также ангиогенез опухоли, активируя сигнальные пути nuclear factor-κB (NF-κB) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) в опухолевых клетках. Эти провоспалительные факторы способствуют развитию рака, индуцируя процессы ангиогенеза, хеморезистентности, подавления иммунных клеток, инвазии и метастазирования опухоли.

Выводы. При сравнении микробиома опухоли и метастатического лимфоузла на уровне вида, обнаружена бактерия - Methylobacterium radiotolerans. Согласно последним исследованиям, она может влиять на иммунную микросреду опухоли, что указывает на потенциальную роль Methylobacterium radiotolerans в прогрессии или развитии заболевания. Литературные источники свидетельствуют о том, что хронические бактериальные инфекции тесно связаны с онкогенезом, но их причинно-следственная связь остается противоречивой. До сих пор остается вопрос без ответа относительно того, может ли хроническая воспалительная среда, созданная инфекцией, привести к развитию рака или сам рак может способствовать развитию бактериальной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS: Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 2018, 24(43):4846-4861.
2. Ren B, Cui M, Yang G, Wang H, Feng M, You L, Zhao Y: Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2018, 17(1):108.
3. Xu S, Xiong Y, Fu B, Guo D, Sha Z, Lin X, Wu H: Bacteria and macrophages in the tumor microenvironment. *Front Microbiol* 2023, 14:1115556.
4. Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, Montiel M, Zoltan M, Dong W, Quesada P, Sahin I, Chandra V, San Lucas A *et al*: Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell* 2019, 178(4):795-806.e712.
5. Luo M, Cai J, Luo S, Hong X, Xu L, Lin H, Chen X, Fu W: Causal effects of gut microbiota on the risk of chronic kidney disease: a Mendelian randomization study. *Front Cell Infect Microbiol* 2023, 13:1142140.
6. Sun Z, Bai C, Hao D, Jiang X, Chen J: Gut microbiota and oral cavity cancer: a two-sample bidirectional Mendelian randomization study. *Front Oncol* 2024, 14:1389678.
7. Humbel F, Rieder JH, Franc Y, Juillerat P, Scharl M, Misselwitz B, Schreiner P, Begre S, Rogler G, von Kanel R *et al*: Association of Alterations in Intestinal Microbiota With Impaired Psychological Function in Patients With Inflammatory Bowel Diseases in Remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020, 18(9):2019-2029 e2011.

8. Feng R, Zhang T, Kayani MUR, Wang Z, Shen Y, Su KL, Bielike K, Chen L: Patients with Primary and Secondary Bile Duct Stones Harbor Distinct Biliary Microbial Composition and Metabolic Potential. *Front Cell Infect Microbiol* 2022, 12:881489.
9. Ishaq HM, Mohammad IS, Hussain R, Parveen R, Shirazi JH, Fan Y, Shahzad M, Hayat K, Li H, Ihsan A *et al*: Gut-Thyroid axis: How gut microbial dysbiosis associated with euthyroid thyroid cancer. *J Cancer* 2022, 13(6):2014-2028.
10. Sinha R, Ahn J, Sampson JN, Shi J, Yu G, Xiong X, Hayes RB, Goedert JJ: Fecal Microbiota, Fecal Metabolome, and Colorectal Cancer Interrelations. *PLoS One* 2016, 11(3):e0152126.
11. Rao W, Lin Z, Liu S, Zhang Z, Xie Q, Chen H, Lin X, Chen Y, Yang H, Yu K *et al*: Association between alcohol consumption and oesophageal microbiota in oesophageal squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol* 2021, 21(1):73.
12. Wang H, Altemus J, Niazi F, Green H, Calhoun BC, Sturgis C, Grobmyer SR, Eng C: Breast tissue, oral and urinary microbiomes in breast cancer. *Oncotarget* 2017, 8(50):88122-88138.
13. Chen R, Qi X, Ma B, Xu P, Yuan Y: First case of infective endocarditis caused by Methylobacterium radiotolerans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020, 39(9):1785-1788.
14. Kaneko M, Tominaga Y, Sakamoto K, Shikata H: Hemodialysis vascular access infection caused by Methylobacterium radiotolerans: The first confirmed case in Japan. *J Infect Chemother* 2020, 26(1):107-109.
15. de Cal M, Cazzavillan S, Cruz D, Nalesso F, Brendolan A, Rassu M, Ronco C: [Methylobacterium radiotolerans bacteremia in hemodialysis patients]. *G Ital Nefrol* 2009, 26(5):616-620.
16. Li L, Tarrand JJ, Han XY: Microbiological and clinical features of four cases of catheter-related infection by Methylobacterium radiotolerans. *J Clin Microbiol* 2015, 53(4):1375-1379.
17. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, Lee DJ: Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* 2014, 9(1):e83744.
18. Ma J, Gnanasekar A, Lee A, Li WT, Haas M, Wang-Rodriguez J, Chang EY, Rajasekaran M, Ongkeko WM: Influence of Intratumor Microbiome on Clinical Outcome and Immune Processes in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12(9).

ГЕРАНИЛГЕРАНИЛАЦЕТОН ПОДАВЛЯЕТ ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МСК

Щебетина М.В., Усачёв В.А., Смажило К.Ю., Замотина М.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Воронцова М.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Непрерывное обновление костной ткани является залогом сохранения ее функции в течение жизни человека. В основе его находится баланс между ростом и резорбцией костной ткани, что позволяет поддерживать механические свойства костей и стромальную нишу стволовой клетки, а также обеспечивать их восстановление при повреждении.

Известно, что ключевыми процессами, определяющими рост костной ткани, являются, с одной стороны, дифференцировка резидентных стволовых клеток стромы, а с другой – закладка и минерализация межклеточного матрикса [1]. Оба этих процесса тесным образом взаимосвязаны. Так, механические свойства матрикса определяют способность стволовых клеток к остеогенной дифференцировке [2,3]. Кроме того, матрикс выступает как передатчик контролирующих дифференцировку механических сигналов для стволовых клеток [4]. Продукция матриксных белков в свою очередь требует постоянного вовлечения системы белков теплового шока – шаперонов, обеспечивающих правильное сворачивание новосинтезированных молекул белка, а также поддержание молекул в функциональном состоянии. Этот факт просволяет рассматривать вещества, способные регулировать активность клеточной системы белков теплового шока, как перспективные лекарственные препараты, направленные на регуляцию процессов обновления ткани.

Геранилгеранилацетон (ГГА) является одним из подобных веществ. В литературе, хорошо описана его способность стимулировать повышение уровня белков теплового шока через активацию транскрипционного фактора белков теплового шока (HSF1) [5]. Этот низкотоксичный изотерпен уже применяется в клинической практике, как противоязвенный препарат [6]. При этом, в настоящий момент ведутся исследования о перспективах применения ГГА, как препарата для сохранения функций ткани в печени, почках, сердце и мышцах [7]. Обновление костной ткани представляется важным физиологическим процессом, в котором можно ожидать, что ГГА будет оказывать выраженное положительное воздействие. Тем не менее, на настоящий момент влияние ГГА на процессы обновления костной ткани остается неизвестным. В связи с этим

в нашем исследовании была проведена оценка влияния ГГА на процесс остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) являющихся предшественниками остеобластов в организме человека.

Материалы и методы. МСК линии ASC52telo культивировали в среде DMEM low glucose (Paneco, Moscow, Russian Federation), содержащей 10% FBS (HyClone, Washington D.C., США) и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Среду меняли каждые 3 дня.

Остеогенная дифференцировка индуцировалась в среде DMEM low glucose добавлением 10% FBS, CaCl2 (100 мг/л), пирувата натрия (0.11 мг/мл) дексаметазона (0.1 мкМ), аскорбиновой кислотой (0.2 мМ), глицерол-2-фосфата (10 мМ) и L-глутамина (2 мМ). Замена среды осуществлялась каждые три дня.

Нами было принято решение рассмотреть 3 способа добавления ГГА к клеткам (в качестве контроля использовали внесение равного объема растворителя DMSO).

1. Однократное добавление ГГА перед началом дифференцировки. Для моделирования влияния ГГА на процессы индукции остеогенеза.

2. Добавление ГГА в течение всего времени остеогенной дифференцировки

3. Добавление ГГА в течение конечных этапов дифференцировки.

Дифференцировка продолжалась в течение 15 дней. Оценка эффективности дифференцировки осуществлялась окрашиванием клеток 2% раствором Ализаринового красного и съемкой окрашенных образцов на микроскопе Nikon Eclipse Ti2 цветной камерой Nikon DS-Ri2.

Активацию внутриклеточных кальциевых сигналов оценивали с использованием метода микроскопии одиночных клеток. Клетки выращивали при низкой плотности, чтобы предотвратить межклеточные взаимодействия во время визуализации кальция в среде DMEM low glucose с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина и 0.292 мг/мл L-глутамина в 48-луночных планшетах, сутки инкубировали с 10 мкМ ГГА или DMSO (растворитель), а после были окрашены красителем Fluo-8 (Abcam, ab142773, 4 мкМ) в растворе Хенкса с добавлением 20 мМ Hepes, в течение 1 часа.

Для анализа характера ответов на кальций мы записывали базовый уровень в течение 15 минут, затем добавляли 10 нМ ПТГ, не останавливая запись. Внутриклеточные ответы Ca2+ измеряли в отдельных клетках с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0,3 и камерой Kinetix. Мы использовали одновременное измерение полей зрения 2x2 в режиме большого изображения для увеличения количества анализируемых клеток. Видео анализировали с использованием

программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония) и ImageJ. Изменения цитозольного Ca2+ по сравнению с уровнем покоя оценивали по относительным изменениям интенсивности флуоресценции Fluo-8 (ΔF/F0), зарегистрированной в отдельной клетке. Процент ответивших клеток измеряли как отношение количества ответивших клеток к числу всех проанализированных клеток.

Результаты и обсуждения. Результаты индукции остеогенеза в данных условиях представлены на рис. 1.

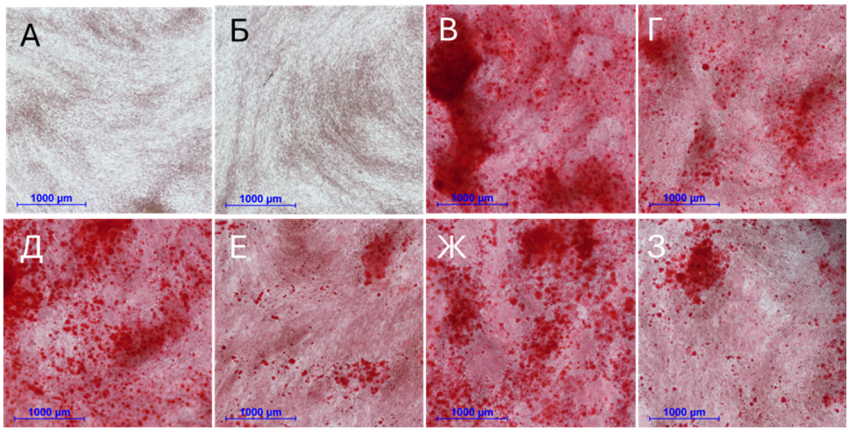


Рис. 1. Эффект ГГА на остеогенную дифференцировку МСК. А – МСК без индукции остеогенной дифференцировки; Б – МСК без индукции остеогенной дифференцировки в присутствии 10 мкМ ГГА; В – индукция остеогенеза после однократного добавления DMSO; Г – индукция остеогенеза после однократного добавления 10 мкМ ГГА; Д – индукция остеогенеза в условиях добавления DMSO на конечные 7 дней дифференцировки; Е – индукция остеогенеза в условиях добавления 10 мкМ ГГА на конечные 7 дней дифференцировки; Ж – индукция остеогенеза в условиях постоянного добавления DMSO; З – индукция остеогенеза в условиях постоянного добавления 10 мкМ ГГА.

Как видно из представленных изображений, добавление ГГА в течение всего времени остеогенеза, а также на последние 7 дней дифференцировки приводит к значительному снижению эффективности остеогенеза. Преинкубация клеток в течение суток с ГГА перед индукцией дифференцировки оказывает менее выраженное влияние на дифференцировку, которое может быть объяснено восстановлением остеогенного потенциала клеток в течение 15 дней дифференцировки после удаления из среды ГГА.

В свете того, что на предыдущем этапе выполнения проекта нами было установлено, что действие геранилгеранилацетона приводит к выраженному снижению эффективности остеогенной дифференцировки МСК, нами было принято решение произвести оценку действия ГГА на кальциевую сигнализацию в МСК. Ранее на кафедре биохимии и регенеративной биомедицины ФФМ МГУ был описан новый механизм регуляции остеогенной дифференцировки МСК в зависимости от паттернов мобилизации внутриклеточного кальция в ответ на гормональный стимул (ПТГ). Используя метод регистрации уровня кальция в единичных клетках, мы обнаружили, что в МСК может формироваться три специфических типа кальциевых ответов: 1) одиночное транзиторное повышение внутриклеточного Ca2+, зависящее от ИФ3; 2) ИФ3-зависимые кальциевые осцилляции; 3) плавное цАМФ-зависимое повышение внутриклеточного Ca2+.

При этом на уровне целой популяции преимущественный вариант ответа определяет активирующее или ингибирующее действие на остеогенез. Индуцируемые осцилляции коррелируют с подавлением остеогенеза, а цАМФ-зависимый прирост Ca2+ - с усилением остеогенной дифференцировки.

Предобработка клеток ГГА в течение суток в значительной степени изменяет соотношение кальциевых ответов в популяции МСК (рис. 2). Происходило увеличение количества клеток отвечающих антиостеогенными осцилляциями кальция, что согласуется с ранее полученными результатами о значительном снижении остеогенного потенциала МСК под действием ГГА.

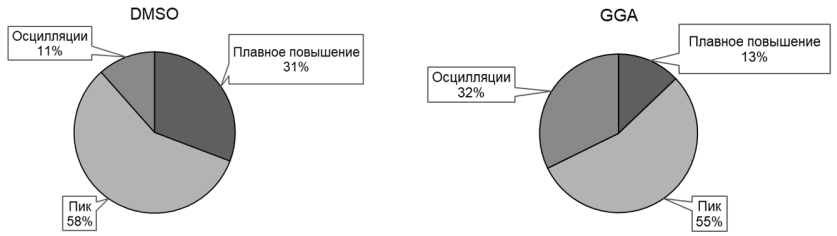


Рис. 2. Соотношение типов кальциевого ответа на ПТГ в МСК, предобработанных DMSO и геранилгеранилацетоном (GGA).

Заключение. Использование регуляторов активности внутриклеточной системы белков теплового шока рассматривается как перспективный метод для поддержания обновления и стимуляции регенерации тканей. В литературе показана эффективность использования ГГА на моделях повреждения/восстановления печени и сердечной мышцы

[7]. В то же время, в наших экспериментах было продемонстрировано, что ГГА не оказывает положительного влияния на остеогенную дифференцировку МСК человека, что возможно ограничивает перспективы его использования для стимуляции восстановления костной ткани. Таким образом, потенциальное повышение уровня внутриклеточных белков теплового шока не может рассматриваться как универсальный подход для индукции активности стволовых клеток. Более подробное изучение участия компонентов системы протеостаза в регуляции клеточных процессов дифференцировки позволит точнее предсказать наиболее перспективные области использования индукторов активности внутриклеточной системы белков теплового шока.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 19-75-30007, https://rscf.ru/project/19-75-30007/ (биохимия и подходы в области молекулярной биологии) и гранта программы Научно-образовательных школ МГУ имени М.В. Ломоносова, проект № 23-SCH04-11 (клеточные модели).

ЛИТЕРАТУРА

1. Solidum J. G. N. et al. Differential regulation of skeletal stem/progenitor cells in distinct skeletal compartments //Frontiers in Physiology. – 2023. – V. 14. – P. 1137063.
2. Novoseletskaya E. et al. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – V. 8. – P. 555378.
3. Olivares-Navarrete R. et al. Substrate stiffness controls osteoblastic and chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells without exogenous stimuli //PloS one. – 2017. – V. 12. – №. 1. – P. e0170312.
4. Manokawinchoke J. et al. Intermittent compressive force promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells by regulating the transforming growth factor-β pathway //Cell death & disease. – 2019. – V. 10. – №. 10. – P. 761.
5. van Marion D. M. S. et al. Oral geranylgeranylacetone treatment increases heat shock protein expression in human atrial tissue //Heart Rhythm. – 2020. – V. 17. – № 1. – P. 115-122.
6. Nakazawa S. et al. Serum and stomach tissue levels of geranylgeranylacetone in patients //International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology. – 1983. – V. 21. – №. 6. – P. 267-270.
7. van Marion D. M. S. et al. Oral geranylgeranylacetone treatment increases heat shock protein expression in human atrial tissue //Heart Rhythm. – 2020. – V. 17. – №. 1. – P. 115-122.

Научное издание

Международная конференция
РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ
(19-23 мая 2025 г.)
Сборник статей

Том 1

Под редакцией
А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 07.05.2025. Формат 60x84$_{1/16}$ Бумага офсетная
Печать цифровая. Печ. л. 21,97.
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

ISBN 978-5-6049994-4-8

ISBN 978-5-6049994-5-5

НАШИ ПАРТНЕРЫ

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, реагентики, так и по подбору необходимого оборудования для Ваших исследований. Обращайтесь в нашу Компанию, и Вы обязательно останетесь довольны! **www.biopik.ru**

Молекулаб – ваш надежный партнер в оснащении лабораторий Мы поставляем высококачественное оборудование и расходные материалы для лабораторий.
Наши преимущества:
· Прямые контракты с производителями – отсутствие посредников, выгодные цены
· Короткие сроки поставки импортного оборудования и реагентов;
· Надежная логистика с контролем условий хранения (температура, влажность)
· Гарантийная поддержка и консультации по продукции
· Ориентация на долгосрочное сотрудничество с лабораториями и торговыми организациями.
Наша миссия: обеспечение научных, медицинских лабораторий в области геномики, протеомики, микробиологии, клеточной биологии и криминалистики оборудованием, реагентами и расходными материалами с оперативной доставкой и профессиональной поддержкой. Посетите наш интернет-магазин **www.moleculab.ru**, где можно ознакомиться с полным портфолио нашей компании, оформить заказ или получить консультацию.

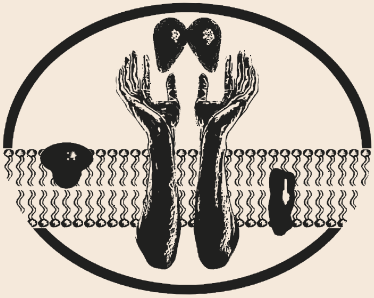
Диаэм – первая российская компания, ориентированная на комплексное оснащение научных лабораторий биологических, химических и медицинских учреждений, а также лабораторий биотехнологических, фармацевтических и химических производств, государственных контрольных и экспертных лабораторий.
Каталог компании насчитывает десятки тысяч товарных позиций оборудования, расходных материалов и реактивов.
Высококвалифицированные специалисты Диаэм проконсультируют по любым вопросам и помогут подобрать оборудование под индивидуальные задачи заказчика.
Собственный сервисный центр Диаэм производит пуско-наладочные работы и обучение пользователей, гарантийный и послегарантийный ремонт, профилактическое техническое обслуживание.
На сайте **http://www.dia-m.ru** и с помощью мобильного приложения легко найти интересующий товар, проверить наличие на складе, сделать заказ и отследить его выполнение.
Адрес: 129345, Москва ул. Магаданская д. 7 корп. 3**.** Тел.: +7(495)745-05-08, 8(800)234-05-08. E-mail: **info@dia-m.ru**, **www.dia-m.ru**, **https://t.me/mskdiam**

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

19–23 мая 2025 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 2

Под редакцией
А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой

Пущино
2025

УДК 576.3
ББК 28.05
Р 45

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

Локальный оргкомитет:
д.б.н. *Бережнов А.В.*, к.б.н. *Федотова Е.И.*, к.б.н. *Надеев А.Д.*,
к.б.н. *Мальцева В.Н.*, к.б.н. *Гайдин С.Г.*, к.б.н. *Крицкая К.А.*,
к.б.н. *Ларюшкин Д.П.*, *Цай А.А.*, *Сидорова М.В.*, *Тюрин Ф.В.*

Р45 **Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. /** Под редакцией А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2025. – 378 с.

ISBN 978-5-6049994-3-1 (Т. 2)
ISBN 978-5-6049994-5-5

С 19 по 23 мая 2025 г. в г. Пущино проходила Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В сборнике представлены тексты 131 статьи по материалам докладов участников конференции.
В первый том вошли разделы:
– общие и частные вопросы сигнализации;
– сигнализация с участием ионных каналов и рецепторов;
– кальциевая сигнализация;
– сигнализация в мышечных клетках;
– посттрансляционные модификации в регуляции внутриклеточных процессов;
– сигнализация при апоптозе и в условиях стресса. Активные формы кислорода в системе внутриклеточной сигнализации;
– особенности сигнализации в стволовых и опухолевых клетках.
Второй том содержит разделы:
– сигнализация в нейронах и синапсах;
– внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация;
– сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика;
– сигнализация в растительных клетках;
– действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации;
– новые подходы и методы клеточных исследований.

УДК 576.3
ББК 28.05

ISBN 978-5-6049994-3-1 (Т. 2)
ISBN 978-5-6049994-5-5

© Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2025

Сигнализация в нейронах и синапсах

ДОМИНИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОЗРЕВАНИЯ НЕЙРОТРОФИНА МОЗГА ОБЕСПЕЧИВАЕТ ЕГО РЕТРОГРАДНОЕ ВЛИЯНИЕ В НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

Богачева П.О., Потапова Д.А., Гайдуков А.Е.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Введение. Нейротрофин мозга (BDNF) и его предшественник проBDNF могут секретироваться мышечными волокнами в качестве миокинов и оказывать антагонистичное ретроградное действие как на созревание моторных синапсов в эмбриогенезе или при реиннервации [1,2], так и разнообразно модулировать передачу сигналов в зрелых, и новообразованных синапсах [3-6]. В ЦНС созревание BDNF может происходить как внутриклеточно, за счет протеолиза проBDNF фурином или другими проконвертазами, так и внеклеточно, с участием матриксных металлопротеиназ или системы тканевой активатор плазминогена/плазмин [7,8]. При этом характер созревания нейротрофина в скелетной мускулатуре практически не изучен [2]. Целью данной работы было выявить доминирование вне- или внутриклеточной локализации созревания BDNF в реиннервированных мышечных волокнах с новообразованными моторными синапсами. Секрецию эндогенного нейротрофина мозга из мышечных волокон индуцировали стимуляцией постсинаптических рецепторов, активируемых протеазами (PAR1) [3,4].

Методика. Эксперименты проводили с использованием взрослых мышей линии C57/Bl6 обоих полов. Для получения нервно-мышечных препаратов с новообразованными синапсами хирургически денервировали мышцу-длинный разгибатель пальца (*m. extensor digitorum longus*), раздавливая малоберцовый нерв (*n. peroneus*) под изофлурановой анестезией (5%). Спустя 11 суток после операции мышей умерщвляли посредством быстрой декапитации для выделения нервно-мышечных препаратов, которые помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл и перфузировали при комнатной температуре оксигенированным (95% O_2, 5% CO_2) раствором Лайли (pH 7.2-7.4) [6]. С использованием внутриклеточных острых микроэлектродов и усилителя Axoclamp-2B регистрировали спонтанные миниатюрные потенциалы концевой пластинки или вызванные стимуляцией нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (МПКП и ПКП, соответственно). При изучении вызванной ритмической активности синапсов предварительно рассекали мышечные волокна, используя стандартный протокол [4] и

стимулировали нерв короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 Гц, 1 с, длительность стимулов 0.1 мс). Перед стимуляцией нерва регистрировали МПКП в течении 100 с, среднее значение их амплитуд использовали для вычисления квантового состава ПКП. В контроле регистрировали МПКП и/или ПКП от 5 и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в добавляли исследуемые вещества, и далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 60 – 120 минут или дольше. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. Сигналы анализировали в программе MiniAnalysis. Оценивали мембранный потенциал (МП) мышечных волокон, амплитуду и временной ход МПКП и ПКП, частоту МПКП. Амплитуды МПКП и ПКП стандартизировали к МП -50 мВ в случае регистрации на рассеченном препарате и к -70 мВ при исследовании только МПКП. Квантовый состав ПКП рассчитывали как отношение средней стандартизованной и корректированной на нелинейную суммацию амплитуды ПКП [5] к средней стандартизованной амплитуде МПКП. Нормальность распределения значений в выборках оценивали по тесту Д'Агостино-Пирсона. Далее применяли t-критерий Стьюдента или ANOVA для сравнения нормально распределенных выборок и критерий Манна-Уитни в случае распределения, отличающегося от нормального. Для сравнения кумулятивных вероятностей распределения амплитуд МПКП применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Двухфакторный ANOVA (с апостериорным критерием Бонферрони) применяли при анализе параметров ПКП.

Данные на рисунках представлены в виде среднего±ст.ош.ср. Уровень значимости отличий между выборками составлял 0.05, (n – количество исследованных синапсов).

Результаты. В первой серии экспериментов исследовали влияние пептида-агониста рецепторов PAR1 (TFLLR-NH_2, 1 мкМ) на параметры спонтанной секреции АХ. Данный агонист PAR1 вызывал действие, аналогичное выявленному нами ранее для другого пептидного стимулятора PAR1 TRAP6-NH_2 (SFLLRN-NH_2, 1 мкМ) [3] или тромбина (1 нМ) [4] – возрастание амплитуды МПКП на 30% по сравнению с контролем. Остальные параметры спонтанной секреции АХ не изменились (рис. 1). Аналогичное возрастание амплитуд МПКП наблюдалось и при действии в новообразованных моторных синапсах экзогенного BDNF (1 нМ) [4,6] или его продомена (1 нМ), и оно было связано с увеличением размера квантов АХ на пресинаптическом уровне [5]. Таким образом, активация постсинаптических PAR1 в регенерирующих моторных синапсах обеспечивает ретроградное пресинаптическое потенцирующее действие зрелого нейротрофина и, возможно, его продомена.

Участие матриксной металлопротеиназы 3 (MMP-3) во внеклеточном созревании BDNF тестировали с помощью ее ингибитора NNGH (10 мкМ).

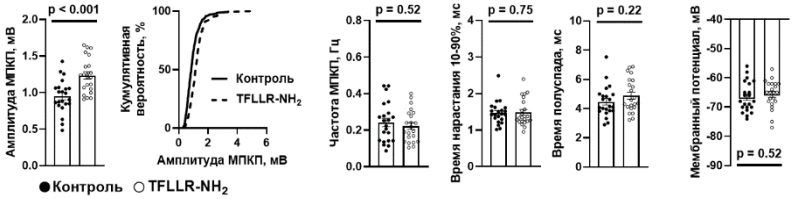


Рис. 1. Активация PAR1 их селективным агонистом TFLLR-NH_2 (1 мкМ) (n=22) вызывает увеличение амплитуд МПКП по сравнению с контролем (n=22).

NNGH сам по себе не вызывал какого-либо изменения ни спонтанной (рис. 2А), ни вызванной секреции АХ (рис. 2Б). Ингибирование MMP-3 не предотвращало возрастание амплитуд МПКП при стимуляции PAR1 (рис. 2В), что может говорить о неучастии этой внеклеточной металлопротеиназы в созревании BDNF в новообразованных моторных синапсах, несмотря на ее возможное там присутствие [9].

Далее использовали проникающий в клетку селективный ингибитор фурина BOS-318 (0.5 мкМ) [10]. Действие BOS-318 на нервно-мышечные препараты в течение двух часов, достаточное для проявления эффектов, связанных с ингибированием фурина в других экспериментальных объектах [10], само по себе не повлияло на характеристики спонтанной и вызванной квантовой секреции АХ в новообразованных моторных синапсах (рис. 3А,Б). Однако при таком остром ингибировании фурина стимуляция PAR1 не приводила к возрастанию амплитуд постсинаптических потенциалов. В присутствии BOS-318 в течение 2х часов агонист PAR1 вызывал снижение частоты МПКП и небольшое увеличение МП мышечных волокон (рис. 3В). Таким образом, в новообразованных моторных синапсах мыши в условиях снижения протеазной активности фурина стимуляция PAR1 полностью воспроизводила действие экзогенного проBDNF [5].

Под действием BOS-318 в новообразованных моторных синапсах утратилось и характерное для стимуляции PAR1 потенцирование вызванной многоквантовой секреции АХ в коротких залпах ПКП - возрастание амплитуд МПКП и ПКП без изменения квантового состава ПКП [4]. Активация PAR1 при ингибировании фурина приводила к эффекту, характерному для действия проBDNF в новообразованных синапсах [5] – отсутствию статистически значимых изменений амплитуды и квантового состава ПКП по сравнению с контролем (рис. 3Г).

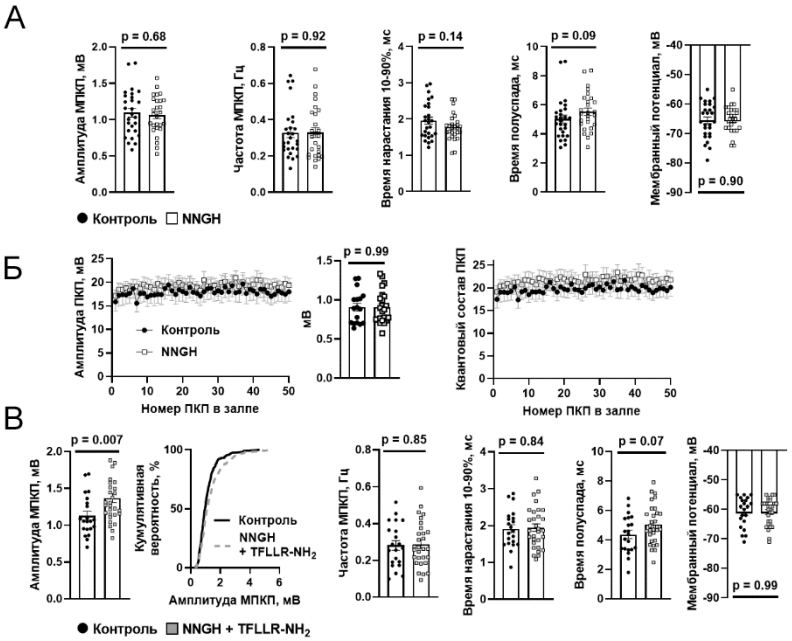


Рис. 2. Матриксная металлопротеиназа 3 (MMP-3) не принимает участия в созревании эндогенного нейротрофина мозга в новообразованных моторных синапсах. (А) Ингибитор MMP-3 NNGH (10 мкМ) (n = 27) не меняет характеристики спонтанной секреции ацетилхолина по сравнению с контролем (n = 27). (Б) Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле (n = 17) и под действием NNGH (10 мкМ) (n = 23). На врезке – амплитуда МПКП. (В) NNGH (10 мкМ) не предотвращает увеличение амплитуд МПКП (эффект, характерный для BDNF) под действием агониста PAR1 (1 мкМ) (n = 30) по сравнению с контролем (n = 21).

Заключение. Проведенные электрофизиологические исследования с использованием селективных ингибиторов MMP-3 и фурина позволили получить новые приоритетные данные о неучастии MMP-3 и ключевой роли именно внутриклеточной проконвертазы фурина в многостадийном процессе созревания BDNF в реиннервированных скелетных мышечных волокнах. Острое угнетение активности фурина при индукции секреции эндогенного нейротрофина способно обеспечивать смену проявления эффектов с потенцирующих спонтанную секрецию АХ, характерных для зрелого BDNF, на тормозные, присущие проBDNF.

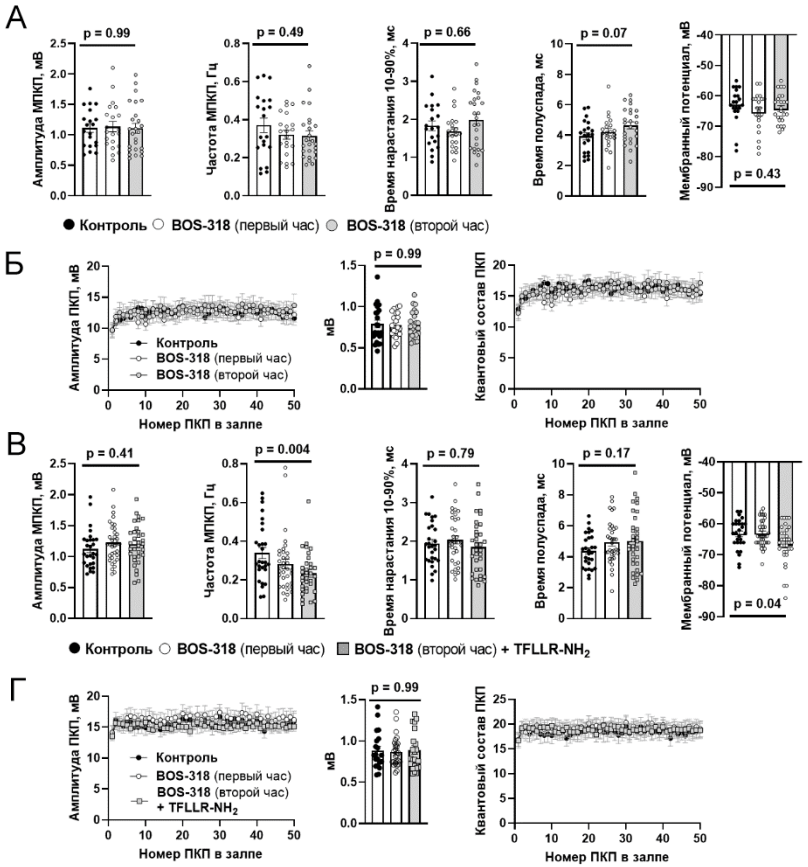


Рис. 3. Фурин обеспечивает внутриклеточное созревание нейротрофина мозга в новообразованных моторных синапсах. (А) Ингибитор фурина BOS-318 (0.5 мкМ) (n = 21 – в течение 1го часа, n = 25 в течение 2го часа) не изменяет параметры МПКП по сравнению с контролем (n = 20). (Б) Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле (n = 22) и под действием BOS-318 (n = 21 в течение 1го часа, n = 23 в течение 2го часа). На врезке – амплитуда МПКП. (В) BOS-318 (0.5 мкМ) при действии в течение 2х часов (n = 35) обеспечивает снижение частоты МПКП и возрастание МП вышечных волокон при активации PAR1 их агонистом (1 мкМ) (n = 33) по сравнению с контролем (n = 28). (Г) Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле (n = 20), под действием BOS-318 (n = 28) и при стимуляции PAR1 агонистом в присутствии BOS-318 (n = 24). На врезке – амплитуда МПКП.

Направленное изменение экспрессии или активности фурина потенциально способно изменять баланс образования, секреции и выраженности ретроградного влияния зрелого BDNF, его продомена или пронейротрофина. Это может быть важным не только с точки зрения оперативного регулирования синаптической передачи в новообразованных синапсах, но в контексте изменения скорости и выраженности реиннервации, поскольку BDNF и проBDNF функционируют в качестве разнонаправленно действующих сигналов, регулирующих элиминацию излишних моторных синапсов в эмбриогенезе или в ходе реиннервации мышцы [1].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 24-25-00073.

ЛИТЕРАТУРА

1. Je HS, Yang F, Ji Y, Nagappan G, Hempstead BL, Lu B. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(39):15924-15929.
2. Aby K, Antony R, Eichholz M, Srinivasan R, Li Y. Enhanced pro-BDNF-p75NTR pathway activity in denervated skeletal muscle. Life Sci. 2021;286:120067.
3. Gaydukov AE, Akutin IA, Bogacheva PO, Balezina OP. Changes in the Parameters of Quantal Acetylcholine Release after Activation of PAR1-Type Thrombin Receptors at the Mouse Neuromuscular Junctions. Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol. 2018;12(1):33-42.
4. Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E, et al. Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. Cells. 2019;8(7):762.
5. Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE. ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. Front Cell Neurosci. 2022;16.
6. Bogacheva PO, Potapova DA, Gaydukov AE. Sortilin and L-type Calcium Channels May be Involved in the Unusual Mechanism of proBDNF Signaling in Regenerating Mouse Neuromuscular Junctions. Neurochem Res. 2025;50(2):104.
7. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. Science. 2004;306(5695):487-491.
8. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. Cell Mol Neurobiol. 2018;38(3):579-593.
9. Vansaun M, Herrera AA, Werle MJ. Structural alterations at the neuromuscular junctions of matrix metalloproteinase 3 null mutant mice. J Neurocytol 2003 329. 2003;32(9):1129-1142.
10. Douglas LEJ, Reihill JA, Ho MWY, et al. A highly selective, cell-permeable furin inhibitor BOS-318 rescues key features of cystic fibrosis airway disease. Cell Chem Biol. 2022;29(6):947-957.e8.

ЭФФЕКТ ЭНДОГЕННЫХ ПУРИНОВ НА ВЫЗВАННОЕ ЭЛЕКТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕРВА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И УРОВЕНЬ АФК В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ

Гиниатуллин А.Р.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Введение. Ацетилхолин (АХ) является основным медиатором, высвобождаемым из двигательных нервных окончаний позвоночных животных. Вместе с АХ в синаптическую щель высвобождается один из широко встречаемых в центральной и периферической нервной системе ко-медиаторов – АТФ. Попадая в синаптическую щель, АТФ последовательно ферментативно гидролизуется до аденозина, в каскаде реакций катализируемых экзо-нуклеотидазами. При этом сама АТФ, АДФ и другие продукты гидролиза пурина, взаимодействуя с рядом подтипов большого семейства собственных рецепторов [1], расположенных в том числе и пресинаптической мембране двигательного нервного окончания (НО), могут динамически изменять уровень секреции АХ, в зависимости от степени электрической активности мотонейрона. В частности в нервно-мышечном синапсе, пуринами опосредуется угнетение квантовой секреции медиатора, описанное еще в конце XX века [2].

Ранее в работах, проведенных на нервно-мышечном синапсе холоднокровных [3,4] и теплокровных [5] животных, был показан $P_2Y_{12\text{-}13}$/G_i-белок/Ca^{2+}_{in}/ПКС/NADPH-оксидаза/АФК (H_2O_2) – зависимый путь, модуляции процесса секреции АХ вызванной стимуляцией двигательного нерва при действии экзогенных пуринов (АТФ/АДФ). При этом, необходимо отметить, что высокая концентрация ионов K^+_{out}, вызывая деполяризацию двигательного НО и последующее квантовое высвобождение АХ и АТФ [6, 7], так как и электрическая стимуляция НО [8], приводила к увеличению внутри- и внеклеточного уровня одной, из наиболее стабильных [9] АФК - H_2O_2 [5]. Важно подчеркнуть, что обнаруженные изменения концентраций оксиданта, хорошо коррелируют с диапазоном физиологических концентраций H_2O_2 [9].

H_2O_2 в низких микромолярных концентрациях угнетает, как спонтанную, так и вызванную секрецию медиатора из двигательного НО, при разных паттернах электрической активности мотонейрона [11]. Причем мембрано-проникающий окислитель хлорамин-Т или фармакологическое снижение уровня глутатиона клетки, приводят к тому же эффекту на секрецию медиатора, что и аппликация H_2O_2. Эти данные, указывают на пропорциональное уровню синаптической активности,

изменение секреции медиатора при действии H_2O_2 [11]. А так же говорят о внутриклеточной локализации redox-чувствительных сайтов модуляции уровня секреции медиатора из двигательных НО.

Учитывая выше описанные экспериментальные данные, данное исследование было направленно на оценку выраженности контроля (по механизму обратной отрицательной связи) уровня секреции медиатора, эндогенными пуринами, высвобождаемыми в синаптическую щель в месте с АХ, при разных частотах стимуляции двигательного нерва мыши, а так же оценку уровня эндогенных АФК (H_2O_2) – как одной из сигнальных молекул опосредующей эти изменения.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы BALB/c мышей при постоянной температуре омывающего раствора $25C^0$. Мышцу фиксировали на силгарте в термостатируемой стеклянной ванночке и в течение всего эксперимента проводили перфузию стандартным физиологическим раствором Рингера (pH 7.3-7.4) для теплокровных следующего состава (мМоль): NaCl 120, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, глюкоза 11, $NaHPO_4$ 1, $NaHCO_3$ 24, с предварительной аэрацией газовой смесью 95% O_2, 5% CO_2, в течении часа. Используемые реактивы были разведены до рабочей концентрации непосредственно перед аппликацией через систему перфузии. Все использованные вещества фирмы «Sigma–Aldrich», за исключением антагониста P_2Y_{13} подтипа пуриноцепторов MRS 2211 (Tocris).

Электрофизиология. Отведение токов концевой пластинки (ТКП) производили в условиях двух-электродной фиксации мембранного потенциала мышечных волокон с использованием стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 3-5 МОм и заполненных 2.5 Моль KCl. Для регистрации ТКП проводили раздражение диафрагмального нерва прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0,1 мс сверхпороговой амплитуды с частотой 0,05Гц, а так же 10, 20, 50 и 70Гц по 100 импульсов в пачке. Для предотвращения сокращения препарата мышцу предварительно, последовательно рассекали. Подробнее метод описан в [5].

Флуоресцентная микроскопия. Для оценки динамики изменения общего уровня окислителей в клетке, использовали АФК чувствительные флуоресцентный маркер 5-(и 6)-карбокси-2`,7`-дихлородигидрофлуоресцин диацетата (CM-H_2DCFDA) (InvitrogenT). Подробнее методика с использованием CM-H_2DCFDA описана в [5]. В данной серии, для предотвращения сокращения мышцы при раздражении двигательного нерва, препарат не рассекался, а в омывающий мышцу раствор добавлялся тубокурарин (2 мкМоль) [5].

Все данные представлены как средние значения ±sem (n=количеству клеток / животных), с достоверностью различий по t-тесту Стьюдента в случае $p<0.05$.

Результаты. Ранее на нервно-мышечном синапсе мыши нами было показано, что аппликация АДФ (10 мкМоль), как основного агониста P_2Y_{13} подтипа рецепторов, приводит к обратимому угнетению квантового высвобождения медиатора, вызванного редкой стимуляцией двигательного нерва (0,05Гц), выражаемому в снижении амплитуды ТКП к 15 мин аппликации пурина [11]. Эффект носит пресинаптическую природу, так как амплитудо-временные характеристики спонтанной секреции медиатора – параметры МТКП (регистрируемые на не рассеченных мышечных волокнах – 60 мВ) при аппликации АДФ [11] не менялись.

Для оценки возможного влияния эндогенный пуринов (АТФ), высвобождаемых вместе с АХ, на уровень квантовой секреции медиатора в ходе электрической стимуляции двигательного НО, первоначально была произведена оценка динамики секреции медиатора (по выраженности изменений амплитуды ТКП) при разных частотах стимуляции (10, 20, 50 и 70 Гц последовательно с 3-4 минутными интервала восстановления – 0,05 Гц) в контроле. Во всех мышечных клетках нервно-мышечного препарата, где проводилась регистрация ТКП в ответ на ритмическую стимуляцию, сперва регистрировали МТКП - для последующей оценке квантового состава секреции данного синапса.

В ходе данного протокола стимуляции, динамика изменения амплитуды ТКП носила двух - фазный характер – первоначальное быстрое и дальнейшее разно-выраженое медленное снижение. К концу ритмической стимуляции амплитуда последнего ТКП в пачке, составляла 75,6±1,5% 71,8±3% 54,2±2% и 56±2,1% от амплитуды первого ТКП в пачке, в случае 10, 20, 50 и 70Гц, соответственно ($p<0,05$; n=32-38/12-15). В дальнейшем было показано, что на фоне присутствия в омывающем препарат растворе, в течении всего эксперимента, блокатора P_2Y_{13} подтипа рецепторов – MRS 2211 (5мкМоль) депрессия амплитуд ТКП, в ответ на ритмическую стимуляцию с частотами 50 и 70 Гц, была мене выражена. Так к концу ритмической стимуляции амплитуда последнего ТКП в пачке, составляла 61,5±2,1% и 60,7±2% от амплитуды первого ТКП в пачке, в случае 50 и 70 Гц, соответственно ($p<0,05$; n=32-35/12-16). При этом ритмическая стимуляции с частотой 10 и 20 Гц, приводила к сопоставимому с контролем снижению амплитуды ТКП (отношение 1 и 100 ТКП в пачке) ($p>0,05$; n=32-38/12-16).

Ранее [5], было показано что длительная (10 мин) стимуляция (20 Гц) двигательного нерва, нервно-мышечных препаратов предварительно «загруженных» АФК-чувствительным красителем

СМ-H_2DCFDA, приводит к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции терминали НО, по сравнению с ее контрольным уровнем, фиксируемым в течение 10 мин. до стимуляции, что свидетельствует об увеличении уровня эндогенных оксидантов (H_2O_2). На ряду с этим, аппликация АДФ в течении 15 мин, так же приводит к обратимому росту уровня флуоресценции НО [5].

В следующей серии экспериментов была предпринята попытка оценить роль эндогенных пуринов и P_2Y_{13} рецепторов в данном эффекте. В экспериментах, проведенных на предварительно «загруженных» СМ-H_2DCFDA нервно-мышечных препаратах, длительная стимуляция (20 Гц) двигательного нерва на фоне присутствия MRS 2211 (5 мкМоль) в омывающем растворе, не приводила к какому-либо достоверному росту интенсивности флуоресценции нервных окончаний. Так к 10 мин. стимуляции интенсивность флуоресценции терминалей НО составила 105,7±2,3% ($p>0,05$; $n=7/7$) относительно изначальных значений, тогда как в контроле она увеличивалась до 222±21% ($p<0,05$; $n=7/7$) [5]. Это подтверждало литературные и ранее полученные нами данные о том, что данный подтип рецепторов определяет наблюдаемые эффекты эндогенных пуринов. И что продукция АФК, является одним из элементов сигнального пути, в итоге определяющего уровень секреции медиатора.

Таким образом можно говорить о том, что при разной частоте электрической стимуляции окончаний двигательного нерва, высвобождаемые в ходе квантовой секреции медиатора эндогенные пурины, способны изменять динамику высвобождения секреции АХ, в зависимости от частоты и продолжительности стимуляции, то есть от уровня активности мотонейрона. Это наблюдается только при высоких частотах (≥50Гц) стимуляции, что вероятно объясняется большим количеством высвобождаемых пуринов и тем самым накопление их в синаптической щели [8]. А H_2O_2, может являть одной из ряда сигнальных молекул, образование которой обусловлено активацией P_2Y_{13} подтипа рецепторов мембраны НО. Необходимо отметить, что H_2O_2 так же может образовываться в мышечной клетке и ретроградно оказывать модулирующее действие на секрецию медиатора. Эти данные способствуют более детальному пониманию роли пуринов как нейромодуляторов холинергической коммуникации возбудимых клеток и повышают возможность использования селективных лигандов различных подтипов пуриноцепторов, в качестве терапевтических агентов для улучшения нервно-мышечной передачи в условиях развивающейся дисфункции мионеврального соединения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burnstock G. Purine and purinergic receptors // Brain and Neuroscience Advances. 2018. № 2. P. 1-10.
2. Ribeiro J.A., Walker J. The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on trensmission at the rat and frog neuromuscular junctions // Br.J.Pharmac. 1975. № 54. P. 213-218
3. Giniatullin AR, Grishin SN, Sharifullina ER, Petrov A.M., Zefirov AL and Giniatullin RA. Reactive oxygen species contribute to the presynaptic action of extracellular ATP at the frog neuromuscular junction/J. Physiol 2005 565.1. P. 229-242.
4. Giniatullin A., Petrov A., Giniatullin R. The involvement of P2Y12 receptors, NADPH oxidase, and lipid rafts in the action of extracellular ATP on synaptic transmission at the frog neuromuscular lunction. // Neuroscience. 2015. № 285. P. 324-332.
5 AR. Giniatullin, KA. Mukhutdinova, AM. Petrov Mechanism of Purinergic Regulation of Neurotransmission in Mouse Neuromuscular Junction: The Role of Redox Signaling and Lipid Rafts // Neurochemical Research. 2024. Vol. 49. P. 2021-2037.
6. Guarracino JF, Cinalli AR, Veggetti MI, Losavio AS (2018) Endogenous purines modulate K(+)-evoked ACh secretion at the mouse neuromuscular junction // J Neurosci Res. 2018. 96:1066-1079.
7. Liley AW The effects of presynaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction // J Physiol. 1956 . 134. P. 427-443.
8. J G Sanabria, M H Paso, T Frontera, A Losavio Effect of endogenous purines on electrically evoked ACh release at the mouse neuromuscular junction // J Neurosci Res. 2022. 100(10). P.1933-1950.
9. Celia María Curieses Andrés, José Manuel Pérez de la Lastra, Celia Andrés Juan, Francisco J. Plou and Eduardo Pérez-Lebeña Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies // Stresses. 2022. 2. P. 256-274.
10. Huang BK, Sikes HD Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration // Redox Biol .2014. 2. P. 955-962.
11. Giniatullin A., Petrov A., Giniatullin R. Action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction // Neuroscience. 2019. № 399. P. 135-145.

СЕРОТОНИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ

Крещенко Н.Д.[1], Митьковский Д.Е.[2]

[1]Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия
[2]ГБПОУ Московский областной гуманитарный колледж, Серпухов, Россия

Введение. Свободноживущие плоские черви – планарии используются как модельный объект при изучении регенерации, стволовых клеток, эволюции нервной системы, механизмов мышечного сокращения. Нервная система этих животных является хорошо дифференцированной. С помощью радиоиммунологических, гистохимических и ультраструктурных методов в нейронах планарий обнаружены как классические нейротрансмиттеры, характерные для высших многоклеточных (нейропептиды, катехоламины, биогенные амины и оксид азота), так и медиаторы, специфические для данного таксона [1]. Геном планарий *Schmidtea mediterranea* секвенирован [2].

Серотонин [3] обнаружен у животных, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы. У позвоночных серотонин регулирует чувство голода, температуру тела, болевую чувствительность, модулирует настроение, сексуальное поведение и выделение гормонов. У планарий сведения о локализации и функциональной роли серотонина немногочисленны.

Работа посвящена идентификации серотонина у планарий *Schmidtea mediterranea* (Turbellaria, Playhelminthes) с помощью иммуцитохимического метода, с использованием специфических антител, и флуоресцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Материалы и методы. Планарий содержали в аквариумах с водопроводной и дистиллированной водой в затененном помещении при 19–21ºС. Кормили животных 2 раза в неделю личинками насекомых (мотылем). Перед опытом животных оставляли голодными в течение 7 дней. Для иммуноцитохимической окраски брали планарий размером 8-9 мм, плоско фиксировали (n=12) между предметным и покровным стеклом в 4% параформальдегиде (PFA) на 0.1 М фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7.4) 2 ч при комнатной температуре, затем переносили в пробирки в свежий раствор PFA на 4 ч при 4ºС. Образцы промывали в 0.1 М PBS, содержащем 0.3% Тритона X-100, 0.1% азида натрия и 0.1% бычьего сывороточного альбумина в течение18 ч при 4ºС. Препараты инкубировали 5 дней при 4ºС с первичными антителами, полученными у кролика (1:500, Immunostar), промывали и помещали во вторичные AlexaFluor488 меченые иммуноглобулины (козьи-анти-кроличьи, Abcam,

1:500) на 4 дня при 4ºС. После финальной промывки препараты заключали в 75% глицерин. Для контроля специфичности иммуноокраски образцы инкубировали: (а) только со вторичными иммуноглобулинами без использования первичных антител, и (б) использовали не иммунную сыворотку вместо первичной антисыворотки. Оба контроля (n=5) показали отсутствие окраски в тканях. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B с цифровой фотокамерой DC300F (Leica Mycrosystems, Германия) ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН. Использовали флуоресцентный фильтр I3 со спектром возбуждения 450-490 нм и спектром эмиссии 515 нм.

Результаты. Исследование выявило наличие серотонин-иммунопозитивной (-ип) окраски у планарий *S. mediterranea*. Обнаружено обилие серотонин-ип клеток и нервных волокон (нейритов). Серотонин-ип нейроны и нейриты входят в состав головного нервного ганглия, брюшных нервных стволов и нервных комиссур. Головной ганглий, расположен в переднем отделе тела, и имеет подковообразную форму (рис. 1А). Внутренняя часть ганглия – нейропиль, состоит из тонких серотонин-ип нервных волокон. Тела серотониновых нейронов в головном ганглии располагаются в основном по периферии дуги ганглия. Распространены униполярные и биполярные нейроны, редко можно заметить мультиполярные нейроны.

Брюшные нервные стволы берут начало от головного ганглия и простираются к хвостовому отделу тела (рис. 1А-Г). Стволы соединены тонкими серотонин-ип нервными комиссурами (рис. 1Б, В). Тела мультиполярных серотониновых нейронов, расположены по периферии нервных стволов, в то время как центральная часть ствола образована тонкими отростками серотониновых нейронов (рис. 1Б, Г). По внутренней стороне нервных стволов расположены в основном биполярные и мультиполярные нейроны, по внешней – униполярные. Вдоль нервных комиссур наблюдали веретенообразные биполярные серотонин-ип нейроны, входящие в состав комиссуры (рис. 1В). Выявлены утолщения нервных стволов – нервные узлы, в которых находится от 5 до 8 нейронов (рис. 1В). Между нервными стволами по всей длине тела планарии расположено множество мультиполярных нейронов, имеющих от трех до четырех-пяти отростков, часто связанных между собой. От стволов, многочисленные серотонин-ип нервные волокна, разветвляясь, направляются к боковым краям тела, формируя периферическую нервную сеть. Между боковыми краями тела планарии и нервными стволами также находятся мультиполярные или биполярные серотонин-ип нейроны округлой или овальной формы (рис. 1Г). Вместе многочисленные серотонин-ип нервные волокна и тела нейронов составляют периферические отделы нервной системы, а именно, субмышечный и субэпителиальный нервные плексусы.

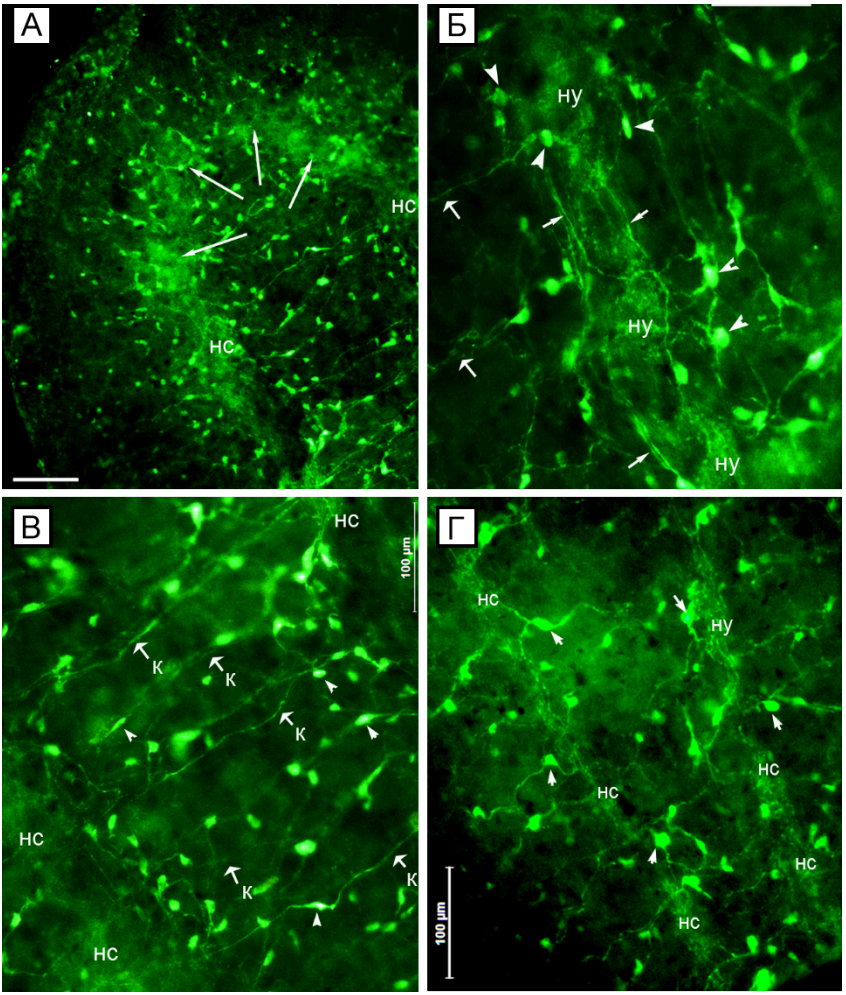


Рис. 1. Окраска к серотонину (зеленым) в нервной системе планарий *S. mediterranea*,флуоресцентная микроскопия, тотальные препараты. А – головной конец, дуга головного ганглия (стрелки), нервные стволы (нс), масштаб 100 мкм; Б – серотонин-ип нервные волокна в составе нервного ствола (тонкие стрелки), би- и мультиполярные нейроны окружают нервный узел (ну, острия стрелок), поперечные нервные комиссуры (тупые стрелки), масштаб 30 мкм; В – тонкие нервные комиссуры (к, тупые стрелки), соединяют нервные стволы (нс), нейроны в составе поперечных комиссур (острия стрелок), масштаб 100 мкм; Г – хвостовой отдел тела планарии, более тонкие нервные стволы (нс), нервные узлы (ну), и серотониновые нейроны (острия стрелок), масштаб 100 мкм.

Варьирование размера и формы серотониновых нейронов, а также числа отростков, отходящих от тела клетки (уни-, би- и мультиполярность) зависит, вероятно, как от места их локализации в теле планарии, так и от возможной функциональной роли.

Обсуждение. У нескольких видов планарий серотонин был идентифицирован ранее: у *Dendrocoelum lacteum* [4,5], *Polycelis tenuis* [5], *Polycelis nigra* [6], *Dugesia japo*nica [7], *Bipalium kewense* [8], *Crenobia alpina* [9] и *Castrella truncata* [10], серотонин был также найден в нейронах глотки [11] и центральной нервной системы планарий *Girardia tigrina* [12]. Большинство сведений были получены при изучении серийных срезов тканей планарий. В настоящей работе были прокрашены тотальные препараты, что позволило извлечь максимум информации о пространственной локализации серотонинергических нервных элементов в различных отделах нервной системы, не прибегая к сложной реконструкции морфологических данных при анализе срезов.

Проведенные исследования показали присутствие серотонина в нервной системе планарий *S. mediterranea*, что согласуется со сведениями, имеющимися в отношении других видов. У *S. mediterranea* интенсивная окраска к серотонину была обнаружена в головном ганглии, нервных стволах и комиссурах, а также в периферических отделах нервной системы планарий. Нами были выявлены дополнительные, не описанные ранее, детали строения серотонинергической нервной системы планарий. Так, обнаружено, что большее количество серотониновых нейронов локализовано со стороны внутренней поверхности дуги головного ганглия и брюшных нервных стволов. Выявлено большое число серотонин-ип нейронов, расположенных между нервными стволами. Между нервным стволом и поверхностью тела наблюдали интенсивно развитую серотонин-ип нервную сеть, состоящую из многочисленных и разветвленных нервных отростков. Обнаружено, что в головном ганглии нейроны имели более округлую форму, а в нервных стволах тела нейронов вытянуты и имеют овальную или неправильную форму. Отмечена аккумуляция серотонинергических нейронов в головном отделе тела, по сравнению с хвостовым.

О физиологической роли серотонина у планарий имеются лишь минимальные сведения. Функциональные тесты выявили положительное влияние серотонина на биение ресничек, покрывающих поверхность тела планарий [13]. Возбуждающее влияние серотонина в отношении мускулатуры планарий показано у *Procerodes littoralis* [14].

Проведенное иммуноцитохимическое исследование позволило дополнить имеющиеся в литературе сведения. Результаты свидетельствуют о широком распространении серотонина в нервной системе представителей Platyhelminthes, и о необходимости детального исследования функциональной роли серотонина у плоских червей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шейман И.М., Крещенко Н.Д. Регенерация планарий: экспериментальный объект. *Онтогенез.* 2015;46(1):3-12.
2. Robb SMC, Gotting K, Ross E, Sánchez Alvarado A. SmedGD 2.0: The *Schmidtea mediterranea* genome database. *Genesis*. 2015;53:535-546.
3. Rapport MM, Green AA, Page IH. 1948. Crystalline Serotonin. *Science*. 1948;108 (2804), 329-330.
4. Плотникова СИ, Кузьмина ЛВ. Распределение нервных элементов, содержащих биогенные амины, у представителя плоских червей - молочно-белой планарии *Dendrocoelum lacteum*. В кн.: Физиология и биохимия беспозвоночных. Л.: Наука, 1968; с. 23-29.
5. Reuter M, Gustafsson MKS, Mäntylä K, Grimmelikhuijzen CJP. The nervous system of Tricladida. III. Neuroanatomy of *Dendrocoelum lacteum* and *Polycelis tenuis* (Plathelminthes, Paludicola): an immunocytochemical study. *Zoomorphology*. 1996;116:111-122.
6. Лурье БЛ. Моноаминсодержащие нейроны планарии *Polycelis nigra*. *Вестник МГУ сер. Биол*. 1975;2:3-13.
7. Itoh MT, Igarashi J. Circadian rhythm of serotonin levels in planarians. *Neuroreport.* 2000;11(3):473.
8. Fernandes MC, Alvares EP, Gama P, Silveira M. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*. Tissue Cell. 2003;35(6):479-486.
9. Kerschbaum H, Freiblmayer K, Pohlhammer K. 1988. Localization of 5-HT and gastrin-cck-immunoreactivity *Crenobia alpina* (Tricladida, Plathelminthes). *Fortschr. Zool.* 1988;36:177.
10. Kotikova EA, Raikova OI, Reuter M, Gustafsson MKS. The nervous and muscular systems in the free-living flatworm *Castrella truncata* (Rhabdocoela): an immunocytochemical and phalloidin fluorescence study. *Tissue Cell*. 2002;34(5):365-374.
11. Kreshchenko N, Reuter M, Sheiman I, Halton DW, Johnston RN, Shaw Ch, Gustafsson MKS. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Dugesia tigrina* (Plathelminthes). *Invertebrate Reproduction and Development*. 1999;35(2):109-125.
12. Kreshchenko ND, Ermakov AM. Morphometric analysis and functional insights into the serotonergic system of *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of Morphology.* 2024;285(8):e21756.
13. Sakharov DA, Golubev AI, Malyutina LV, Kabotyanski EA, Nezlin LP. Serotoninergic control of ciliary locomotion in a turbellarian flatworm. In: Neurobiology of invertebrates: transmitters, modulators and receptors. in: Neurobiology of invertebrates: transmitters, modulators and receptors, Ed. by J. Salanki, KS. Rózsa, Budapest: Akadémiai Kiadó, 1988; pp. 479-491.
14. Крещенко НД. Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий. *Биологические мембраны*. 2020;37(1):34-44.

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ МУСКУЛАТУРЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA*

Крещенко Н.Д.[1], Митьковский Д.Е.[2]

[1]Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия
[2]ГБПОУ Московский областной гуманитарный колледж, Серпухов, Россия

Введение. Планарии, свободноживущие плоские черви (Platyhelminthes), занимают ключевую позицию в эволюции животного мира. У них впервые возникает билатеральная симметрия и происходит концентрация нервных элементов в центральную нервную систему. Пищеварительная система планарий включает глотку – мускулистый трубчатый орган, лежащий в глоточной «камере» в центральной части червя, которая открывается наружу ротовым отверстием на брюшной стороне тела. Через ротовое отверстие глотка способна высовываться наружу и поглощать пищу. Пища затем поступает в разветвленный кишечник, состоящий из однослойного эпителия и окаймляющих его редко расположенных мышечных волокон. Такое строение обеспечивает его функции: пищеварения, и, ввиду отсутствия кровеносной системы у плоских червей, функцию распределения питательных веществ. Планарии, являясь высшим звеном экологической цепи – хищниками, осуществляют в природе стратегию и тактику поиска пищи, проявляя разнообразие поведенческих реакций, контролируемых центральной нервной системой. В нервной системе планарий обнаружены: ацетилхолин, катехоламины, ГАМК, ростовые факторы и нейропептиды [1]. Среди нейропептидов выделяются FMRFамид-подобные пептиды, которые были обнаружены сначала у моллюсков, а затем и у других беспозвоночных, включая плоских червей [2]. Значение данной группы пептидов остается малоизученным. Однако, считается, что одной из важных функций этих пептидов является их участие в регуляции мышечного сокращения у плоских червей [3].

Целью работы является идентификация пептидергических FMRF-иммунопозитивных (-ип) нервных элементов в отделах пищеварительной системы планарий *Girardia tigrina*. Исследование выполнено с применением специфических антител к нейропептидам FMRF и GYIRF, и анализа тотальных препаратов и замороженных срезов при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

Материалы и методы. Для идентификации специфических нейропептидов применяли непрямой иммуноцитохимический метод. Для анализа использовали как тотальные препараты планарий, так и замороженные срезы тканей, для чего зафиксированные в 4%

параформальдегиде образцы помещали в 10% раствор сахарозы на 4-5 дней. Образцы инкубировали в течение 2-5 дней с первичными кроличьими антителами против пептида FMRF (Immunostar, США), разведенными 1:500 в растворе PBST, содержащем 0,1 M PBS и 1% Тритон X-100 (Sigma, США) или против пептида GYIRF (любезно предоставленных А. Молом, из Королевского Университете г. Белфаста). После промывки в PBST образцы переносили на 5 дней во вторичные флуоресцентно-меченые козьи 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 исследовали с помощью флуоресцентного Leica DM6000B и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (CLSM) Leica TCS SP5 (Leica Microsystem, Германия). Для создания иллюстраций использовали программу Adobe Photoshop CS2 9.0.

Результаты. Применение специфических антител к нейропептиду GYIRF, выявило иммунопозитивную (-ип) окраску в компонентах нервной системы глотки планарий *G. tigrina* (рис. 1А, Б), исследование проведено на серийных срезах. Оказалось, что окраска к пептиду была более выражена в наружной глоточной нервной сети, чем во внутренней (рис. 1Б). GYIRF-ип окраска обнаружена в отдельных нейронах, расположенных вдоль длины глотки. Интенсивная иннервация GYIRFa-ип нервными волокнами была выявлена в базальной области глотки, где нервные волокна формируют пересечения в области якорной зоны глотки, откуда нервные волокна проникают в ткани самой глотки. Двойная окраска фаллоидином и анти-GYIRF показала, что пептидергические нервные волокна спиралевидно обвивают продольные мышечные филаменты, входящие в состав мышечной стенки глотки.

У *G. tigrina* FMRF-ип нервные элементы были обнаружены в глоточной нервной сети (рис. 1В). Окраска более выражена в наружной глоточной нервной сети. Многочисленные тела FMRFa-ип нейронов и их отростки были также выявлены в «якорной зоне» глотки, там, где глотка прикреплена к телу. FMRF-ип окраска была хорошо заметна в нервных волокнах, расположенных между якорными мышцами глотки. В базальной части глотки FMRFa-ип нервные волокна простирались в тело планарии, где соединялись с брюшными нервными стволами. Окружающие глотку ткани – так называемая окологлоточная область, также была пронизана FMRFa-ип нервными волокнами, а тела нейронов расположены неподалеку.

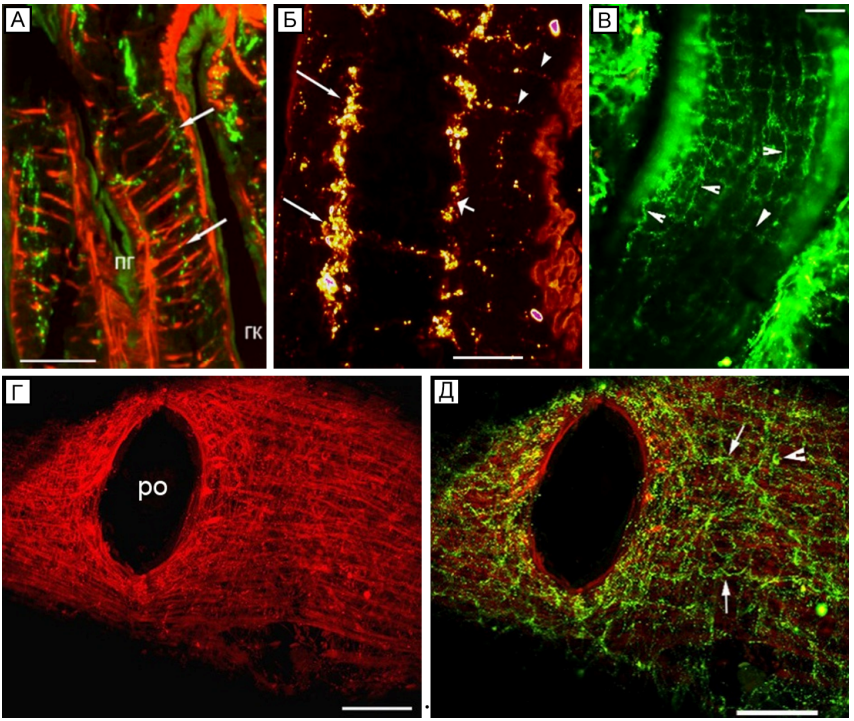


Рис. 1. Окраска к нейропептидам GYIRF (зеленым, желтым на А, Б) и FMRF (зеленым на в, д) в иннервации глотки планарий *G. tigrina*; окраска мускулатуры (красным) TRITC-фаллоидином. А – паттерн GYIRF-ип окраски в нервной системе глотки (стрелки), пг – полость глотки, гк – глоточная камера, масштаб 70 мкм; Б – большее увеличение, окраска к GYIRF в наружной (длинные стрелки) и внутренней (короткая стрелка) глоточных нервных сетях, с отдельными нервными волокнами (острия стрелок), направленными к полости глотки, масштаб 40 мкм; В – FMRF-ип окраска в глоточной нервной сети планарий (острия стрелок), масштаб 50 мкм; Г – ротовое отверстие (ро), мускулатура сфинктера ротового отверстия, масштаб 100 мкм; Д – FMRF-ип нервные волокна (тонкие стрелки) и нейрон (острие стрелки) в области мускулатуры ротового отверстия, масштаб 100 мкм. А-В, замороженные срезы, флуоресцентная микроскопия; Г, Д – тотальные препараты, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

Сильную FMRF-ип окраску наблюдали в многочисленных тонких нервных отростках, иннервирующих ротовое отверстие у *G. tigrina*. Так, мускулистое ротовое отверстие (рис. 1Г, Д), расположенное на брюшной поверхности тела, через которое глотка способна высовываться наружу для поглощения добычи, было интенсивно снабжено FMRF-ип волокнами

и небольшими нейронами (рис. 1Д), находившимися поблизости. Это может указывать на участие FMRF-подобных пептидов в регуляции мускулатуры не только глотки, но и мышечного сфинктера ротового отверстия.

Обсуждение. В настоящем исследовании показано наличие FMRF-ип и GYIRF-ип окраски у планарий *G. tigrina*. Обнаружена пептидергическая иннервация компонентов пищеварительной системы планарий – глотки, глоточной камеры, ротового отверстия, интенсивно снабженных мускулатурой, и принимающих участие в поглощении пищи. Кроме того, интенсивная пептидергическая иннервация выявлена во всей окологлоточной области тела планарии. Сведения о наличии и локализации FMRF-подобных нейропептидов имеются и в отношении ряда паразитических представителей плоских червей. Так, FMRF-ип нейроны и их волокна выявлены в центральных и периферических отделах нервной системы паразитических трематод, включая церебральные ганглии, вентральные нервные стволы, поперечные комиссуры [4]. FMRF-иммунопозитивная реакция обнаружена также в нервных элементах, иннервирующих специализированную мускулатуру пищеварительной, а также репродуктивной системы гельминтов [5,6]. Экспериментально был установлен возбуждающий эффект нейропептида GYIRF на сократительную активность мышечных препаратов фасциолы *F. hepatica* [7], который реализуется, вероятно, посредством G-протеин-связанного рецептора (GPCR), при участии фосфолипазы С и протеинкиназы С [3]. Среди плоских червей, первый пептидный GPCR был идентифицирован именно у планарий. Лигандами этого рецептора служат FMRF-подобные пептиды, такие как GYIRF, а также подобные пептиды нематод, среди которых наиболее активным был PNFLRF [8]. Таким образом, постепенно аккумулируются сведения о наличии, локализации, функциональной роли и механизмах действия FMRF-подобных пептидов у плоских червей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шейман ИМ, Крещенко НД. Регенерация планарий: экспериментальный объект. *Онтогенез*, 2015; 46(1):3-12.
2. Mousley A, Novozhilova E, Kimber M, Day T. Neuropeptide physiology in helminths. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2010; 692:78-97.
3. Graham MK, Fairweather I, McGeown J. Second messengers mediating mechanical responses to the FARP GYIRFamide in the fluke *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2000;279(6):R2089-2094.
4. Kreshchenko ND, Terenina ND, Poddubnaya LG, Voropaeva EL, Mochalova NV, Kuznetsov GV, Movsesyan SO. *Acrolichanus auriculatus* (Digenea, Allocreadiidae): surface topography, musculature and FMR-Famide-like immunoreactivity in the nervous system. *Zoomorphology*. 2024; 143:313-328.

5. Terenina NB, Kreshchenko ND, Movsesyan SO. Musculature and neurotransmitters of internal organs of trematodes (the digestive, reproductive and excretory systems). Zoology, 2022; 150:125986.
6. Кузнецов ГВ, Крещенко НД, Кучин АВ, Яшин ВА, Мочалова НВ, и др. Идентификация FMRF-подобных пептидов в репродуктивной системе паразитических трематод (Platyhelminthes). *Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация*. 2023; 1: 221-224.
7. Marks NJ, Johnston S, Maule AG, Halton DW, Shaw C, Geary TG, Moore S, Thompson DP. Physiological effects of platyhelminths RFamide peptides on muscle-strip preparations of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology*. 1996; 113:393-401.
8. Omar HH, Humphries JE, Larsen MJ, Kubiak TM, Geary TG, Maule AG, Kimber MJ, Day TA. Identification of a platyhelminth neuropeptide receptor. *Int. J. Parasitol.* 2001; 37(7):725-733.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ ТОНИЧЕСКОГО ВЫДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

Маломуж А.И.[1,2]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ
Казанский научный центр РАН, Казань, Россия
[2]Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева – КАИ, Казань, Россия

Введение. Межклеточный контакт между мотонейроном и скелетным мышечным волокном до сих пор остается одной из наиболее удачных и общепризнанных моделей для изучения процессов сигнализации между нейроном и другой электровозбудимой клеткой [1].

Сигнализация в нервно-мышечном синапсе, как правило, рассматривается в аспекте передачи электрического возбуждения (потенциала действия) с мотонейрона на мышечное волокно, которая опосредуется выделением из нервного окончания химического посредника – нейромедиатора (ацетилхолина). Потенциал действия в нервном окончании приводит к относительно синхронному экзоцитозу ряда (от десятка до сотен) синаптических везикул, содержащих ацетилхолин. В результате этого события в синаптической щели резко возрастает концентрация нейромедиатора, который, активируя холинорецепторы на постсинаптической мембране, приводит к возникновению электрического ответа в мышечном волокне [2].

Ацетилхолин выделяется из нейрона не только в ответ на стимуляцию, но и тонически. При этом нейромедиатор выделяется как в виде порций (квантов) при самопроизвольном экзоцитозе синаптических везикул, так и в виде отдельных молекул, невезикулярным (неквантовым) способом [3]. При анализе механизмов тонического выделения ацетилхолина было установлено, что подавляющая часть нейромедиатора в отсутствие электрической активности двигательного нерва выделяется именно неквантовым образом [4,5].

Неквантовое выделение ацетилхолина. Электрофизиологическая регистрация неквантового выделения ацетилхолина в нервно-мышечном препарате впервые была осуществлена в конце 70-х годов прошлого века [6,7]. К настоящему моменту с помощью этого метода исследований установлено, что неквантовая секреция ацетилхолина из двигательного нервного окончания – это активный процесс выделения молекул нейромедиатора в синаптической области. Данный вид нейросекреции обладает уникальной зависимостью как от ионного состава окружающей среды [8], так и от липидного состава плазматической мембраны [9].

Согласно различным оценкам исследователей, посредством механизма неквантового выделения в синаптической щели поддерживается уровень ацетилхолина в районе десятков наномолей [10].

Практически сразу после получения доказательств наличия такого способа выделения ацетилхолина встал вопрос о роли этого процесса. И если изначально полагали, что физиологического значения скорее всего нет (в связи с чем нередко использовался термин «неквантовая утечка» нейромедиатора), то со временем сформировалось достаточно четкое представление о нейротрофической роли выделяемого таким образом ацетилхолина [10]. Так, в частности было показано, что (i) именно неквантовым образом ацетилхолин выделяется из конуса роста мотонейрона (когда везикулярного аппарата для нейромедиации ещё нет) [11]; (ii) неквантовое выделение ацетилхолина после перерезки нерва прекращается задолго до нарушения процесса спонтанной квантовой нейросекреции [12] и совпадает по времени с развитием первых денервационных симптомов, развивающихся в мышце [13]; (iii) при реиннервации мышцы неквантовое выделение ацетилхолина регистрируется раньше появления первых признаков везикулярного освобождения нейромедиатора [12]. Относительно недавно, с использованием современных методов исследований, было доказано, что тоническое влияние наномолярных концентраций холиномиметика предотвращает развитие атрофии в скелетных мышцах [14].

Регуляция неквантового выделения ацетилхолина. Согласно современным представлениям о межклеточной сигнализации, в том числе и в нервно-мышечном контакте, при экзоцитозе синаптических везикул в межклеточное пространство выделяются не только молекулы ацетилхолина, но и ряд соединений, названных ко-медиаторами [3]. Так, общепризнанным ко-медиатором ацетилхолина является АТФ [15]. При этом, есть все основания утверждать, что и глутамат и нейропептид N-ацетиласпартилглутамат также могут выделяться в качестве ко-медиатора ацетилхолина [16,17]. Получены доказательства выделения в синаптическую щель нервно-мышечного контакта и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [18].

При исследовании роли метаботропных мускариновых холинорецепторов в функционировании нервно-мышечного синапса было обнаружено, что активация, как минимум, одного из подтипа этих белков приводит к угнетению процесса неквантового выделения ацетилхолина. Анализ молекулярного механизма действия мускариновых холиномиметиков на тоническую секрецию нейромедиатора выявил участие М1 холинорецепторов и фермента NO-синтаза [19], которые локализованы постсинаптически [20,21]. Интересно отметить, что NO-синтаза оказалась вовлеченной и в механизм глутамат-опосредуемого угнетения неквантового выделения ацетилхолина [22]. В данном случае

усиление синтеза молекул NO опосредовалось активацией глутаматных NMDA рецепторов, которые позднее были выявлены на постсинаптической мембране мышечного волокна [23]. Нейропептид N-ацетиласпартилглутамат, как оказалось, также угнетающе влияет на процесс неквантового выделения ацетилхолина из двигательного нервного окончания и его эффект также опосредовался усилением активности NO-синтазы [24].

АТФ, как и предыдущие сигнальные молекулы, также угнетает процесс неквантовой секреции ацетилхолина. Анализ механизма действия данного общепризнанного ко-медиатора ацетилхолина показал вовлечение пресинаптических метаботропных пуриновых P2Y рецепторов и фосфолипазы С [25]. При этом была продемонстрирована аддитивность и независимость регуляторных механизмов глутамата и АТФ, угнетающих неквантовую секрецию ацетилхолина.

ГАМК также приводила к снижению уровня неквантового выделения нейромедиатора и этот эффект аминокислоты реализовывался через активацию метаботропных ГАМКБ рецепторов с последующим вовлечением все той же фосфолипазы С [26].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в условиях паттерна электрической активности как сам медиатор, так и ко-медиаторы приводят к угнетению неквантовой секреции ацетилхолина по принципу отрицательной обратной связи.

Физиологическое значение регуляции неквантового выделения ацетилхолина. В последнее время в нейробиологии развивается концепция «синаптического гомеостаза», суть которой заключается в том, что в межклеточном контакте имеет место пул сигнальных путей, которые направлены на поддержание работоспособности синапса за счет регуляции синаптической активности в зависимости от изменения паттерна стимуляции [27]. В этой связи, вышеописанные многоконтурные механизмы регуляции неквантового выделения ацетилхолина в периферическом синапсе вполне вписываются в данную концепцию. Так, в покое преобладает неквантовая форма выделения медиатора, что необходимо для реализации трофического влияния нерва на мышцу. В период паттерна электрической активности при передаче возбуждения на мышцу происходит массированный экзоцитоз синаптических везикул. Ацетилхолина, как и ко-медиаторов, при этом в межклеточном пространстве появляется с избытком и запускаются сигнальные пути, направленные на ингибирование неквантовой секреции ацетилхолина. По окончании периода электрической активности высокий уровень ацетилхолина падает (вследствие диффузии и гидролиза ферментом ацетилхолинэстеразой), концентрация ко-медиаторов в синаптической щели также уменьшается (вследствие гидролиза или работы систем обратного захвата). В результате, уровень неквантового выделения снова

восстанавливается. Таким образом, в межклеточном пространстве, с одной стороны, наблюдается гомеостаз базального уровня нейромедиатора независимо от паттернов стимуляции, а с другой, реализуется процесс передачи возбуждения и «сэкономленный» при ингибировании неквантового выхода ацетилхолин может идти на заполнение синаптических везикул для обеспечения более длительного периода передачи возбуждения.

Работа выполнена за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан» (Соглашение №70/2024-ПД от 16.12.2024).

ЛИТЕРАТУРА

1. Slater CR. Neuromuscular Transmission in a Biological Context. *Compr Physiol.* 2024;14:5641–5702.
2. Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 2001;64:393–429.
3. Malomouzh AI, Nikolsky EE. Modern concepts of cholinergic neurotransmission at the motor synapse. *Biochemistry (Moscow) Suppl Series A Membrane and Cell Biology* 2018;12(3):209–222.
4. Mitchell JF, Silver A. The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. *J. Physiol.* 1963;165(1),117–129.
5. Fletcher P., Forrester T. The effect of curare on the release of acetylcholine from mammalian motor nerve terminals and an estimate of quantum content. *J. Physiol.* 1975;251(1):131–144.
6. Katz B, Miledi R. Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 1977;196:59–72.
7. Vyskocil F, Illes P. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na+-K+ ATP-ase. *Pflugers Arch.* 1977;370(3):295–297.
8. Vyskocil F, Nikolsky E, Edwards C. An analysis of the mechanisms underlying the non-quantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*. 1983;9(2):429–435.
9. Zakirjanova GF, Giniatullin AR, Gafurova CR, Malomouzh AI, Fedorov NS, Khaziev AN, Tsentsevitsky AN, Petrov AM. Effects of cholesterol oxidase on neurotransmission and acetylcholine levels at the mice neuromuscular junctions. *Arch Biochem Biophys.* 2023;749:109803.
10. Vyskocil F, Malomouzh AI, Nikolsky EE. Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Physiol Res.* 2009;58:763–784.
11. Sun YA, Poo MM. Non-quantal release of acetylcholine at a developing neuromuscular synapse in culture. *J. Neurosci.* 1985;5(3):634–642.

12. Nikolsky EE, Oranska TI, Vyskocil F. Non-quantal acetylcholine release in the mouse diaphragm after phrenic nerve crush and during recovery. *Exp Physiol* 1996;81:341–348.
13. Urazaev A, Naumenko N, Malomough A, Nikolsky E, Vyskocil F. Carbachol and acetylcholine delay the early postdenervation depolarization of muscle fibres through M1-cholinergic receptors. *Neurosci Res*. 2000;37:255–263.
14. Cisterna BA, Vargas AA, Puebla C, Fernández P, Escamilla R, Lagos CF, Matus MF, Vilos C, Cea LA, Barnafi E, Gaete H, Escobar DF, Cardozo CP, Sáez JC. Active acetylcholine receptors prevent the atrophy of skeletal muscles and favor reinnervation. *Nat Commun*. 2020;11:1073.
15. Burnstock G. Purinergic cotransmission. *Exp Physiol*. 2009;94:20–24.
16. Colombo MN, Francolini M. Glutamate at the Vertebrate Neuromuscular Junction: From Modulation to Neurotransmission. *Cells.* 2019;8(9):996.
17. Walder KK, Ryan SB, Bzdega T, Olszewski RT, Neale JH, Lindgren CA. Immunohistological and electrophysiological evidence that N-acetylaspartylglutamate is a co-transmitter at the vertebrate neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*. 2013;37:118–129.
18. Malomouzh A, Ilyin V, Nikolsky E. Components of the GABAergic signaling in the peripheral cholinergic synapses of vertebrates: a review. *Amino Acids.* 2019;51(8):1093–1102.
19. Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskočil F. Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism. *J Neurochem.* 2007;102(6):2110–2117.
20. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001; 81:209–237.
21. Malomouzh AI, Arkhipova SS, Nikolsky EE, Vyskočil F. Immunocytochemical demonstration of M(1) muscarinic acetylcholine receptors at the presynaptic and postsynaptic membranes of rat diaphragm endplates. *Physiol Res.* 2011;60(1):185–188.
22. Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskocil F, Lieberman EM, Urazaev AK. Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. *J Neurochem.* 2003;85:206–213.
23. Malomouzh AI, Nurullin LF, Arkhipova SS, Nikolsky EE. NMDA receptors at the endplate of rat skeletal muscles: precise postsynaptic localization. *Muscle Nerve.* 2011; 44:987–989.
24. Malomouzh AI, Nikolsky EE, Lieberman EM, Sherman JA, Lubischer JL, Grossfeld RM, Urazaev AK. Effect of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) on non-quantal and spontaneous quantal release of acetylcholine at the neuromuscular synapse of rat. *J Neurochem*. 2005;94:257–267.
25. Malomouzh AI, Nikolsky EE, Vyskočil F. Purine P2Y receptors in ATP-mediated regulation of nonquantal acetylcholine release from motor nerve endings of rat diaphragm. *Neurosci. Res.* 2011;71(3):219–225.
26. Malomouzh AI, Petrov KA, Nurullin LF, Nikolsky EE. Metabotropic GABAB receptors mediate GABA inhibition of acetylcholine release in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 2015;135(6):1149–1160.
27. Macleod GT, Zinsmaier KE. Synaptic homeostasis on the fast track. *Neuron*. 2006;52(4):569–571.

РОЛЬ Ca^{2+}-АКЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ КРУГООБОРОТА ВЕЗИКУЛ В ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ

Нуруллин Л.Ф.[1,2], Волков Е.М.[2]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики – структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия
[2]Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Введение. В основе квантовой секреции медиатора в синапсах лежит процесс экзо-эндоцитоза синаптических везикул. В стадии экзоцитоза везикулы сливаются в активных зонах с пресинаптической мембраной и освобождают нейромедиатор в синаптическую щель. После экзоцитоза следует эндоцитоз, который восстанавливает пул синаптических везикул [1]. Процессы рециклинга обеспечивают поддержание везикулярных пулов в нервных терминалях и тем самым сохраняют физиологический характер синаптической секреции медиатора [2]. Общая совокупность синаптических везикул подразделяются на: пул готовый к освобождению, резервный пул и рециклирующий пул [3]. В механизмы экзо- и эндоцитозного цикла синаптических везикул вовлечено множество синаптических протеинов, в том числе Ca^{2+}-акцепторные белки [4]. Они играют важную роль в процессах рециклинга везикул [5]. При этом роль данных белков в кругообороте везикул в нервно-мышечных соединениях эволюционно-первичной соматической мускулатуры остается до конца неясной. Отсюда целью настоящего исследования стало изучение участия Ca^{2+}-акцепторных белков, а именно: кальциневрина, кальмодулина и Ca^{2+}/кальмодулин зависимых протеинкиназ в механизмах экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательных нервно-мышечных синапсах соматической мускулатуры дождевого червя.

Методы исследования. Выделялись мышечные препараты дождевого червя *Lumbricus terrestris* в физиологическом растворе Древеса-Пакса. Состав раствора в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4, 6 $CaCl_2$, 2 Tris, 167 сахароза, pH 7.4, температура 22±1°C. Препараты окрашивались липофильным флуоресцентным маркером FM2-10 в концентрации 22 мкМ. «Загрузка» красителем FM2-10 двигательных нервных терминалей проводилась в течение 3 мин в гиперкалиевом физиологическом растворе (40 мМ K^+). Для уменьшения фонового свечения после загрузки красителя препарат в течение 30 мин отмывали в нормальном растворе при температуре 8±1°C. Микроскопическое исследование образцов проводилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica

TCS SP5 MP, объектив 20×/1.0 NA. Ca^{2+}-акцепторные белки ингибировались блокаторами циклоспорин А, STO-609 и W-5 гидрохлорид. В экспериментах по изучению процессов эндоцитоза везикул, препараты инкубировали в присутствии блокаторов Ca^{2+}-акцепторных белков, окрашивали FM2-10 в гиперкалиевом растворе, отмывали в нормальном растворе, а затем проводили исследование на микроскопе. В следующей серии экспериментов изучали процессы экзоцитоза везикул в двигательных нервных терминалях. Для этого мышечные препараты дождевого червя окрашивали FM2-10 в гиперкалиевом растворе. Затем отмывали в течение 30 мин в нормальном растворе, после чего стимулировали гиперкалиевым раствором и регистрировали флуоресценцию на 0, 3 и 5 минутах «разгрузки» в контроле и после действия веществ. В экспериментах с хелатором BAPTA-AM предварительно окрашенные FM2-10 мышечные препараты инкубировали 30 мин в бескальциевом растворе с хелатором в концентрации 0.5 мМ. Затем препараты в присутствии хелатора разгружали в бескальциевом растворе (0 мМ Ca^{2+}) с высоким содержанием K^+ (40 мМ). Потом регистрировали флуоресценцию нервно-мышечных синапсов при помощи микроскопа на 0, 3 и 5 минутах «разгрузки». Результаты обработки значений флуоресценции приведены в виде среднего и стандартной ошибки среднего (M ± SEM).

Результаты и их обсуждение. Анализ флуоресцентных изображений синаптических контактов, загруженных красителем FM2-10, показал, что уровень флуоресценции составлял в контроле 88.3±1.6 относительных единиц (о.е.) (n=62). При окрашивании мышечного препарата в бескальциевом гиперкалиевом растворе среднее значение флуоресценции составляло 81.5±2.1 о.е. (n=66), которое достоверно не отличалось от контроля ($p>0.05$). Таким образом, отсутствие ионов Ca^{2+} снаружи клеток существенно не влияет на процессы эндоцитоза везикул в нервно-мышечных контактах дождевого червя. В наших условиях деполяризация клеточной мембраны гиперкалиевым раствором в отсутствие ионов Ca^{2+} снаружи клетки приводит к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо и увеличению частоты спонтанной секреции медиатора, что вызывает окрашивание нервных терминалей FM2-10 в процессе экзо-эндоцитоза синаптических везикул.

Инкубация мышечного препарата в растворе в присутствии циклоспорина А в концентрации 10 мкМ приводила к достоверному по сравнению контролем возрастанию на 58% средней величины флуоресценции синапсов, загруженных красителем FM2-10. Значение составило 139.7±1.7 о.е. (n=102; $p<0.001$). Можно полагать, что ингибирование белка кальциневрина циклоспорином А приводит к усилению эндоцитоза везикул в нервно-мышечном соединении дождевого

червя. Применение ингибитора STO-609 в концентрации 30 мкМ достоверно увеличивало среднее значение флуоресценции синапсов на 71% по сравнению с контролем и равнялось 151.9±1.7 о.е. (n=112; p<0.001). Таким образом, ингибирование CaMKK и CaMKII усиливало процессы эндоцитоза в нервно-мышечном контакте дождевого червя. Аппликация на мышечный препарат 50 мкМ специфического антагониста кальмодулина - W-5 гидрохлорида вызывала достоверное возрастание величины флуоресценции нервных терминалей на 65% по сравнению с контролем и была равна 151.9±1.7 о.е. (n=105; p<0.001). Таким образом, инактивация кальмодулина приводила к достоверному увеличению светимости двигательных нервных терминалей в мышечном препарате дождевого червя, что можно трактовать как усиление процесса эндоцитоза.

Инкубация окрашенных маркером FM2-10 мышечных препаратов в течение 3-5 мин в гиперкалиевом растворе приводила к «разгрузке» красителя из нервных терминалей. В контрольных экспериментах на 3-й и 5-й мин происходило снижение значений флуоресценции от начального уровня на 20% и 36%, соответственно. Значения во всех временных точках достоверно отличались друг от друга (p<0.05).

В присутствии специфических блокаторов Ca^{2+}-сенсорных белков циклоспорина А, W-5 гидрохлорида и STO-609 динамика «разгрузки» FM2-10 замедлялась, значения флуоресценции уменьшались на 3-й мин на 7-11%, на 5-й мин на 18-22% от начального уровня. При этом во всех веществах средние значения светимости на 3-й и 5-й мин достоверно отличались от таковых в контроле (p<0.05). Таким образом, ингибирование Ca^{2+}-акцепторных белков кальциневрина, кальмодулина, CaMKK и CaMKII приводит к замедлению «разгрузки» маркера FM2-10 из двигательных нервных терминалей.

В бескальциевом гиперкалиевом растворе происходила «разгрузка» терминалей загруженных FM2-10, однако динамика «разгрузки» красителя несколько замедлялась по сравнению с контрольной кривой и кривыми «разгрузки» в присутствии специфических блокаторов Ca^{2+}-сенсорных белков. При этом на 3-й и 5-й мин «разгрузки» средние значения флуоресценции в бескальциевом растворе достоверно снижались на 9% и 13%, соответственно (p<0.05). Спонтанное освобождение везикул происходит и в отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде, поэтому мы наблюдаем «разгрузку» двигательных нервных терминалей. В нашем случае «разгрузка» красителя из двигательных нервных терминалей несколько тормозится. По-видимому, кроме Ca^{2+} из внутриклеточных депо в процессе спонтанного экзо-эндоцитоза везикул в нервно-мышечном синапсе принимает участие также и внеклеточный Ca^{2+}. Эти результаты согласуются с данными литературы. Так, на центральных и

периферических синапсах млекопитающих показано, что отсутствие ионов Ca^{2+} во внешней среде только частично снижало интенсивность спонтанной секреции везикул с ацетилхолином в нервных терминалях [6,7], а Ca^{2+}, освобождающийся из внутриклеточных запасов, регулирует спонтанное квантовое освобождение нейротрансмиттера [8].

В следующей серии опытов окрашенные FM2-10 нервно-мышечные синапсы разгружали в бескальциевом гиперкалиевом растворе в присутствии проникающего в клетки кальциевого хелатора BAPTA-AM. «Разгрузка» нервных терминалей не происходила, значение флуоресценции на 3-й и 5-й мин снижалось на 1-2%, что достоверно не отличалось от начального уровня ($p>0.05$). Таким образом, хелатирование внутриклеточного Ca^{2+} ингибирует спонтанную секрецию синаптических везикул, что отражается в отсутствие «разгрузки» окрашенных FM2-10 нервно-мышечных синапсов.

Известно, что реакции фосфорилирования-дефосфорилирования синаптических белков играют важную роль в рециклинге везикул. Так, дефосфорилирование синаптических белков кальциневрином влияет на фазу эндоцитоза синаптических везикул [9,10]. В центральных синапсах гиппокампа мозга крысы размер рециклирующего пула везикул регулируется при участии CDK5/кальциневринового пути [11]. На нервно-мышечных соединениях дрозофилы показана роль кальциневрина в усилении процесса эндоцитоза, а также замедлении рециклинга синаптических везикул [12,13]. В наших экспериментах инактивация кальциневрина увеличивала флуоресценцию загруженных FM2-10 двигательных нервных терминалей и замедляла их «разгрузку». Можно полагать, что ингибирование дефосфорилирования внутриклеточных белков приводит к увеличению интенсивности эндоцитоза и, как следствие, возрастанию размеров общего везикулярного пула и ускорению рециклинга синаптических везикул.

Кальмодулин, как наиболее распространённый Ca^{2+}-акцепторный белок, связываясь с другими белками, в том числе с кальциневрином, изменяет их активность, а также способен контролировать рециклинг синаптических везикул через SNARE белковый комплекс [14]. В аудиторных синапсах ЦНС крысы восстановление пула быстро освобождаемых везикул происходит при участии белка кальмодулина [15]. Нами было показано, что ингибирование кальмодулина приводило к увеличению светимости загруженных FM2-10 синапсов и замедлению выхода маркера из терминалей при их «разгрузке» стимуляцией. Таким образом, инактивация кальмодулина также приводит к усилению процесса эндоцитоза везикул, возрастанию размеров общего везикулярного пула, а также ускорению рециклинга синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя.

Известно, что фермент CaMKK участвует в регуляции клеточного транспорта мембранных везикул [16]. Пресинаптическая киназа CaMKII фосфорилирует ряд ключевых белков экзоцитоза везикул, включая синтаксин, синапсин, RIM, SNARE белки и Ca^{2+}-каналы [17]. CaMKII также способна повышать подвижность синаптических везикул и облегчать спонтанное и вызванное квантовое освобождение нейромедиатора [18]. В наших экспериментах инактивация CaMKK и CaMKII в нервно-мышечных синапсах дождевого червя увеличивала флуоресценцию окрашенных FM2-10 терминалей и замедляла динамику их «разгрузки» при стимуляции. Таким образом, можно предположить, что блокирование фосфорилирования ряда ключевых синаптических белков также усиливает процесс эндоцитоза мембран, вызывает увеличение размеров общего везикулярного пула и ускоряет кругооборот синаптических везикул в соматических мышцах дождевого червя. Можно сделать вывод, что в механизмы кальциевой модуляции процессов экзо-эндоцитоза везикул в синапсах эволюционно-первичной мускулатуры аннелид вовлечены такие Ca^{2+}-акцепторные белки, как кальциневрин, кальмодулин и Ca^{2+}/кальмодулин зависимые протеинкиназы.

Благодарности: Работа выполнена за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан» (Соглашение №76/2024-ПД от 16.12.2024).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:301-331.
2. Betz WJ, Wu LG. Synaptic transmission. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr Biol.* 1995;5(10):1098-1101.
3. Rizzoli SO, Betz WJ. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(1):57-69.
4. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:509-547.
5. Igarashi M, Watanabe M. Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca2+ concentrations. *Neurosci Res.* 2007;58(3):226-233.
6. Randic M, Padjen A. Effect of calcium ions on the release of acetylcholine from the cerebral cortex. *Nature.* 1967;215(5104):990.
7. Simpson LL. The role of calcium in neurohumoral and neurohormonal extrusion processes. *J Pharm Pharmacol.* 1968;20(12):889-910.

8. Williams CL, Smith SM. Calcium dependence of spontaneous neurotransmitter release. *J Neurosci Res.* 2018;96(3):335-347.
9. Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ. Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(8):701-710.
10. Cousin MA, Tan TC, Robinson PJ. Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem.* 2001;76(1):105-116.
11. Marra V, Burden JJ, Thorpe JR, Smith IT, Smith SL, Häusser M, Branco T, Staras K. A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron.* 2012;76(3-3):579-589.
12. Kuromi H, Kidokoro Y. The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of Drosophila larvae. *J Neurosci.* 1999;19(5):1557-1565.
13. Kuromi H, Yoshihara M, Kidokoro Y. An inhibitory role of calcineurin in endocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals of Drosophila larvae. *Neurosci Res.* 1997;27(5):101-113.
14. Igarashi M, Watanabe M. Roles of calmodulin and calmodulin-binding proteins in synaptic vesicle recycling during regulated exocytosis at submicromolar Ca2+ concentrations. *Neurosci Res.* 2007;58(5):226-233.
15. Sakaba T, Neher E. Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron.* 2001;32(6):1119-1131.
16. Kennedy G, Gibson O, T O'Hare D, Mills IG, Evergren E. The role of CaMKK2 in Golgi-associated vesicle trafficking. *Biochem Soc Trans.* 2023;51(1):331-342.
17. Xue R, Meng H, Yin J, Xia J, Hu Z, Liu H. The Role of Calmodulin vs. Synaptotagmin in Exocytosis. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:691363.
18. Wang ZW. Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol.* 2008;38(2):153-166.

ИНТЕРФЕРОН α2b УВЕЛИЧИВАЕТ АКТИВНОСТЬ АМРА И КАИНАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В АФФЕРЕНТНОМ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ ВЕСТИБУЛЯРНОГО АППАРАТА ЛЯГУШКИ

Рыжова И.В., Тобиас Т.В.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Провоспалительные цитокины являются активными молекулами врожденного и приобретенного иммунитета и экспрессируются в организме в ответ на аберрантные РНК и ДНК [1]. Природная защитная функция интерферонов (ИФН) широко используется в медицинской практике при лечении онкологических заболеваний, рассеянного склероза и тяжелых вирусных инфекций. Однако применение высоких доз ИФН-а может сопровождаться тяжелыми побочными эффектами, связанными с нарушениями медиаторных функций центральной и периферической нервных систем и приводящими к прекращению лечения. В списке побочных эффектов - острая потеря слуха и равновесия, что относит ИФН к ототоксическим препаратам [2]. Влияние ИФН-ов на синаптические процессы в структурах внутреннего уха практически не проводилось.

Вестибулярный эпителий имеет специфическое строение и сложную медиаторную организацию, которая обеспечивает преобразование тончайших механических раздражений, воспринимаемых волосковой клеткой, в биоэлектрическую активность нервных волокон. Этот процесс происходит с участием глутаматергической, холинергической, допаминергической и опиоидной систем. Афферентный глутаматергический синапс вестибулярного аппарата характеризуется высокой пластичностью, но также и высокой чувствительностью к факторам внешней и внутренней среды, в том числе и к влиянию физиологически активных молекул, экспрессирующихся при воспалении [3-5]. Нам впервые удалось показать, что афферентная глутаматергическая передача вестибулярного эпителия может модифицироваться при воздействии ИФН-а [6]. Цель данной работы состоит в изучении влияния ИФН-а на функции ионотропных глутаматных рецепторов.

Метод: Влияние ИФН-а на синаптическую активность глутаматергического синапса проводилось в опытах *in vitro* в условиях перфузии вестибулярного эпителия растворами очищенного ИФН-а («Интерферон альфа-2b» «Альтевир», ООО Фармапарк), глутамата и агонистов ионотропных глутаматных рецепторов AMPA, каината и NMDA (Sigma). Импульсную активность афферентных волокон,

контактирующих с вестибулярным эпителием заднего полукружного канала, регистрировали при помощи засасывающего электрода с использованием стандартной электрофизиологической установки (подробнее методика описана в статье [6]). Влияние цитокина на ответы глутамата и его агонистов оценивали как отношение максимальной частоты импульсной активности при аппликации глутамата и агонистов ионотропных глутаматных рецепторов к предшествующему уровню фоновой активности. Статистические решения принимали на 5% уровне значимости (p<0.05).

Результаты. ИФНα2b в диапазоне концентраций (0.2–10 нг/мл) повышал уровень фоновой активности афферентных волокон на 30%. Последующее повышение концентрации цитокина сопровождалось дальнейшим повышением уровня фоновой активности. ИФНα2b (10 нг/мл) уменьшал соотношение максимальной частоты импульсной активности при аппликации глутамата к измененному интерфероном уровню импульсной активности. Цитокин модулировал импульсную активность афферентных волокон, восстановленную глутаматом, в условиях блока синаптической передачи в гипер-Mg^{2+} растворе, что доказывает постсинаптическое действие ИФН-а.

Пластичность глутаматергического синапса обеспечивается тесным взаимодействием метаботропных и ионотропных глутаматных рецепторов, подразделяющихся на NMDA и не-NMDA подтипы и различающиеся по строению и кинетике активации. AMPA и каинатные рецепторы обеспечивают наиболее быстрые процессы возбуждения.

При изучении влияния ИФНα2b (10 нг/мл) на ответы, вызванные аппликацией NMDA (50 мкМ), сравнивали величину ответов на аппликацию агониста глутамата до воздействия ИФН-а, после 2-х минутной перфузии синаптической зоны раствором цитокина и через 15 минут после прекращения совместной перфузии и отмывки препарата в нормальном растворе. Несмотря на то, что трек ответа визуально изменялся после 2-х минутного воздействия цитокина и при совместной перфузии растворами NMDA и ИФН-а, значимых различий при воздействии цитокина на амплитуду ответов, вызванных NMDA, до воздействия цитокина, после 2-х минутной перфузии и через 15 минут после прекращения всех воздействий выявить не удалось.

Модулирующее влияние ИФНα2b (10 нг/мл) на ответы, вызванные перфузией вестибулярного эпителия раствором AMPA (2 мкМ), изучали при кратковременном (30-40 с) и длительном (4.5-5 мин) воздействии цитокина.

ИФНα2b и при кратковременной и при длительной перфузии не изменял величину AMPA-вызванного ответа по отношению к тестовому предъявлению AMPA (Рис. 1,2).

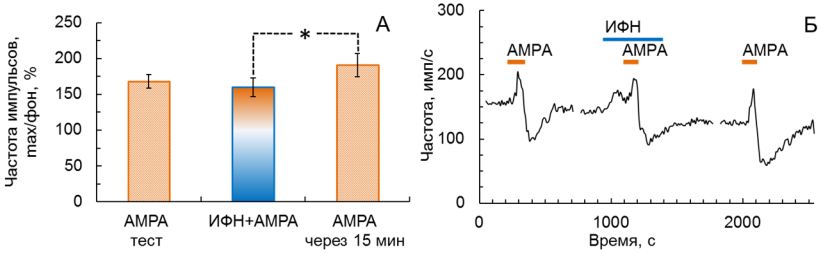


Рис. 1. Динамика изменения импульсной активности афферентных волокон, контактирующих с вестибулярным эпителием заднего полукружного канала, на AMPA-вызванные ответы (2 мкМ) при длительной перфузии раствором ИФНα2b (10 нг/мл). А: суммарная гистограмма, по оси абсцисс – воздействие, по оси ординат - среднее значение и ошибка среднего, Wilcoxon test *p<0.05. Б: оригинальная запись эксперимента. Здесь и далее: горизонтальные линии над записью импульсной активности – время перфузии синаптической зоны исследуемыми препаратами, интервал между аппликацией препаратов составлял 15 минут.

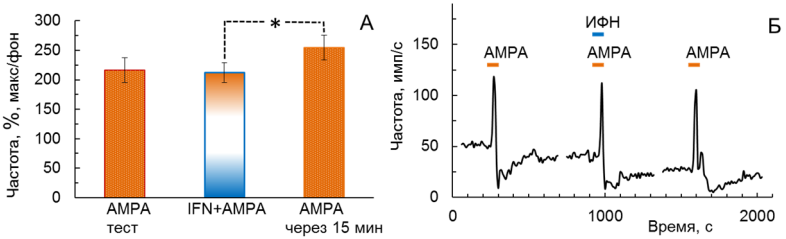


Рис. 2. Динамика изменения импульсной активности афферентных волокон, контактирующих с вестибулярным эпителием заднего полукружного канала при одновременной кратковременной перфузии раствором AMPA (2 мкМ) и ИФНα2b (10 нг/мл). А: суммарная гистограмма, по оси абсцисс – воздействие, по оси ординат - среднее значение и ошибка среднего, Wilcoxon test *p<0.05. Б: оригинальная запись эксперимента.

Интересно отметить, что и при длительном и при кратковременном воздействии ИФНα2b через 15 минут после прекращения совместного действия ИНФα2b и AMPA и последующей отмывки вестибулярного аппарата в нормальном растворе не было выявлено значимых изменений AMPA-вызванных ответов по сравнению с тестовым значением AMPA. (Рис. 2). Однако, значимое отставленное увеличение ответов AMPA через 15 минут после прекращения всех воздействий наблюдалось и по сравнению с ответами AMPA во время совместной кратковременной (тест

Вилкоксона p=0.038; n=9) (Рис. 2) и на фоне длительной перфузии вестибулярного эпителия цитокином (тест Вилкоксона p=0.007; ANOVA p=0.005; n=10). (Рис. 1). После воздействия ИФН-а первоначальный уровень фоновой активности, как правило, не восстанавливался.

Полученные данные позволяют предположить, что время воздействия ИФН-а не играет решающей роли в отставленном потенцирующем влиянии ИФН-а на AMPA рецепторы.

Кратковременная одновременная перфузия синаптической зоны растворами каината (2 мкМ) и ИФН-а (10 нг/мл) вызывала значимое увеличение отношения максимальной частоты импульсной активности относительно предшествующего фона по сравнению с величиной тестового ответа (тест Вилкоксона p=0.016, n=11) (Рис. 3). Значимое увеличение ответа на аппликацию каината сохранялось после 15 минутной отмывки синаптической зоны в нормальном растворе (тест Вилкоксона p=0.05, n=11).

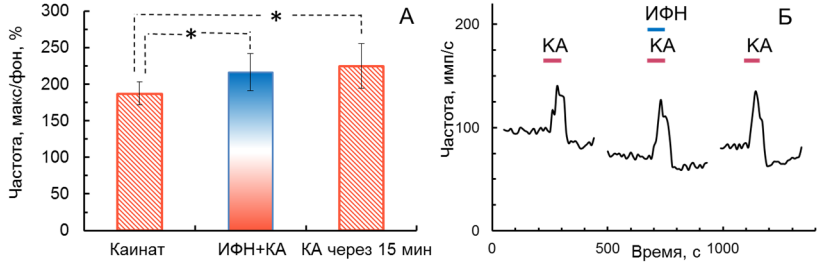


Рис. 3. Динамика изменения импульсной активности афферентных волокон, контактирующих с вестибулярным эпителием заднего полукружного канала при одновременной кратковременной перфузии синаптической области раствором ИФНα2b (10 нг/мл) и каината (2 мкМ). А: Гистограмма, отражающая отношение максимального значения ответа на аппликацию каината к предшествующему уровню фоновой активности в отсутствие и при аппликации интерферона. По оси ординат: среднее и ошибка среднего. Wilcoxon signed-rank test *p<0.05. Б: оригинальная запись типичного эксперимента.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о различном влиянии ИФН-а α2b на NMDA и не-NMDA рецепторы. В данных экспериментальных условиях цитокин не оказывал влияния на NMDA рецепторы, но активировал AMPA-каинатные рецепторы. Тот факт, что потенциирующее влияние ИФН-а на каинатные и AMPA рецепторы наблюдалось в различных временных рамках, позволяет предположить сложное модулирующее влияние ИФН-а на AMPA и каинатные рецепторы с участием различных механизмов. ИФН может рассматриваться в

качестве нейроиммуномодулятора глутаматергической синаптической передачи в афферентном синапсе вестибулярного аппарата.

Авторы благодарят чл.-корр. РАН Шамову О.В. за поддержку проекта, Протасова Е.А. за очистку интерферона, Вершинину Е.А. за статистическую обработку результатов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411784-3-3.1.8).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang BX, Fish EN. Global virus outbreaks: Interferons as 1st responders. *Semin Immunol*. 2019;43:101300. doi:10.1016/j.smim.2019.101300.
2. Mendes-Corrêa MC, Bittar RS, Salmito N, Oiticica J. Pegylated interferon/ribavirin-associated sudden hearing loss in a patient with chronic hepatitis C in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(1):87-89. doi:10.1016/s1413-8670(11)70147-7.
3. Andrianov GN, Nozdrachev AD, Ryzhova IV. The role of defensins in the excitability of the peripheral vestibular system in the frog: evidence for the presence of communication between the immune and nervous systems. *Hear Res*. 2007;230(1-2):1-8. doi:10.1016/j.heares.2007.05.003.
4. Flores A, Soto E, Vega R. Nitric oxide in the afferent synaptic transmission of the axolotl vestibular system. *Neuroscience*. 2001;103(2):457-464. doi:10.1016/s0306-4522(00)00587-x.
5. Ryzhova IV, Nozdrachev AD, Tobias TV, Vershinina EA. Soluble Guanylate Cyclase As the Key Enzyme in the Modulating Effect of NO on Metabotropic Glutamate Receptors. *Acta Naturae*. 2018;10(2):71-78.
6. Ryzhova IV, Korneva EA, Tobias TV, Protasov EA, Vershinina EA. Interferon α2b As a Modulator of the Afferent Glutamatergic Synapse of the Frog Vestibular Apparatus. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2023;17(Suppl.1):S65–S72. https://doi.org/10.1134/S19907478230600773.

СРАВНЕНИЕ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ И НЕ СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ AMPA-РЕЦЕПТОРЫ

Рязанцева П.Е., Бережнов А.В., Гайдин С.Г., Зинченко В.П., Косенков А.М., Ларюшкин Д.П., Майоров С.А.

Институт биофизики клетки, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающих. В то время как его концентрация строго регулируется в нормальных условиях, патологические состояния, такие как церебральная ишемия, травматическое повреждение мозга, гипоксия или эпилепсия, могут вызвать накопление глутамата в синаптической щели [1,2]. Это приводит к развитию эксайтотоксичности, характеризующейся избыточным притоком ионов кальция в нейроны через NMDA- и AMPA- рецепторы, нарушением кальциевого гомеостаза, дисфункцией митохондрий, окислительным стрессом и активацией апоптоз-ассоциированных ферментов, что в конечном итоге приводит к гибели клеток.

Нейроны проявляют различную чувствительность к эксайтотоксическому стрессу. Например, ГАМКергические нейроны демонстрируют особую восприимчивость в условиях травматического повреждения мозга, в то время как существуют региональные различия между нейронами CA1 (более уязвимыми) и CA3 (более устойчивыми) полей гиппокампа [3-5]. Нейроны, экспрессирующие кальций-проницаемые AMPA-рецепторы (CP-AMPAR), могут быть особенно уязвимы из-за их способности обеспечивать дополниьельный приток Ca^{2+}.

AMPA-рецепторы (AMPAR) представляют собой тетрамеры, состоящие из субъединиц GluA1-4. Рецепторы, содержащие субъединицу GluA2, проницаемы только для Na^+ и K^+, в то время как AMPAR, не содержащие GluA2, также проницаемы для Ca^{2+} (CP-AMPAR). CP-AMPAR локализованы преимущественно в определённых ГАМКергических интернейронах, которые играют важную роль в регуляции активности нейрональной сети гиппокампа [6].

Хотя Ca^{2+} является основным фокусом исследований эксайтотоксичности, нарушения гомеостаза Na^+, K^+ и H^+ также вносят значительный вклад в повреждение нейронов. Данное исследование оценивает динамику внутриклеточных ионов в нейронах, содержащих CP-AMPAR, по сравнению с нейронами без них.

Материалы и методы.

Приготовление клеточной культуры. Нейрон-глиальные культуры были получены из гиппокампа новорождённых крыс линии Вистар (P0-2). Извлечённый после декапитации гиппокамп измельчали ножницами и обрабатывали 1% трипсином в растворе Версена в течение 10 минут при 37°C при постоянном перемешивании. Полученную суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали в культуральной среде, состоящей из Нейробазальной среды с добавлением 2% B27, 0,5 мМ глутамина и пенициллина-стрептомицина. Клетки культивировали в CO_2-инкубаторе в течение 13-14 дней перед использованием в экспериментах.

Флуоресцентная микроскопия. Все измерения проводились с использованием инвертированного моторизованного эпифлуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 B, оснащённого монохромной CCD-камерой Hamamatsu 9100C. Динамика внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) оценивалась с использованием флуоресцентных зондов Fura-2 AM и Fluo-3 AM. Fluo-3 использовался в случае одновременной регистрации изменений концентрации двух ионов, один из которых был Ca^{2+}. Окрашивание клеток и эксперименты проводились при 28°C в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS). Для обнаружения изменений внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ использовались флуоресцентные зонды SBFI AM и PBFI AM соответственно. Pluronic F-127 (20% в ДМСО) использовался для облегчения проникновения зондов в клетки. Конечная концентрация обоих зондов в рабочих растворах составляла 2 мкМ. Клетки инкубировались с зондами в течение 60 минут в темноте. Динамика внутриклеточного pH оценивалась с использованием pH-чувствительного флуоресцентного зонда SNARF-1 AM. Клетки окрашивали в течение 40 минут при 28°C с концентрацией зонда 5 мкМ в HBSS. Для анализа изображений использовалось программное обеспечение ImageJ. Для расчёта сигналов использовались соотношения интенсивностей флуоресценции 340/387 для ратиометрических зондов (Fura-2, SBFI AM, PBFI AM) или F/F_0 для Fluo-3 и SNARF-1, где F_0 - интенсивность флуоресценции на первом кадре серии. Корреляции между изменениями внутриклеточной концентрации ионов (коэффициенты Пирсона) оценивались с помощью программного обеспечения OriginLab.

Результаты и обсуждение.

Различия в чувствительности нейронов к глутаматной эксайтотоксичности. В ходе экспериментов нами было установлено, что при моделировании глутаматной эксайтотоксичности путём аппликации 100 мкМ глутамата в течение 3 минут с последующей отмывкой, по кинетике изменения $[Ca^{2+}]_i$ все нейроны могут быть условно разделены на 3 популяции (рис. 1): 1-я группа – нейроны, способные быстро (в течение

минут) восстанавливать $[Ca^{2+}]_i$; 2-я группа – нейроны, способные восстанавливать $[Ca^{2+}]_i$, но за длительный период времени (десятки минут); 3-я группа – нейроны, не способные восстанавливать $[Ca^{2+}]_i$ даже спустя длительный период (больше 30 минут).

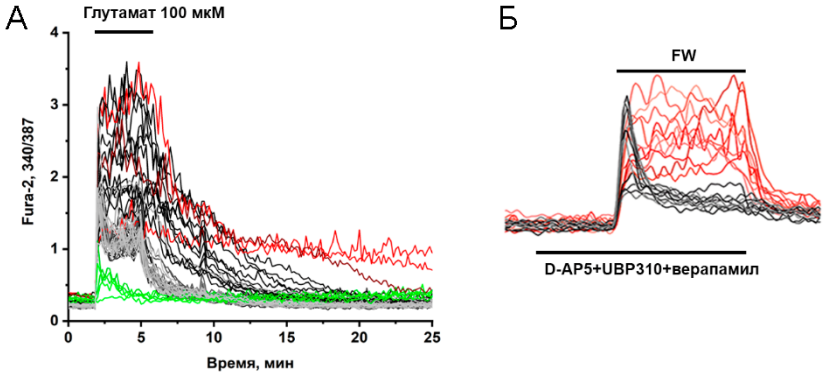


Рис. 1. (А) Реакция различных популяций нейронов (серые, чёрные и красные кривые) на аппликацию 100 мкМ глутамата и последующую отмывку. Зелёные кривые соответствуют ответам астроцитов. (Б) Схема идентификации нейронов, содержащих кальций-проницаемые AMPA-рецепторы (красные кривые). Серые кривые соответствуют нейронам, не содержащим кальций-проницаемые AMPA-рецепторы. FW – 5-фторвиллардиин (агонист AMPA-рецепторов, 500 нМ); D-AP5 (10 мкМ), UBP310 (10 мкМ), верапамил (300 мкМ) – антагонисты NMDA-, каинатных рецепторов и блокатор потенциал-зависимых кальциевых каналов, соответственно.

Кальциевый гомеостаз CP-AMPA нейронов в условиях глутаматной эксайтотоксичности. Для идентификации нейронов, содержащих кальций-проницаемые AMPA-рецепторы, был использован ранее опубликованный метод [7]. Схема идентификации показана на рис. 1Б. Нейроны, содержащие CP-AMPA-рецепторы (CP-AMPA нейроны), демонстрировали значительно более медленное восстановление $[Ca^{2+}]_i$ даже после воздействия умеренных доз глутамата (10 мкМ) по сравнению с нейронами без CP-AMPAR (не-CP-AMPA нейроны). Примерно 80% CP-AMPA нейронов показали либо медленное снижение $[Ca^{2+}]_i$, либо устойчивое повышенное плато после повторной добавки глутамата (рис. 2), что указывает на нарушение кальциевого гомеостаза и принадлежность ко второй и третьим группам, описанным выше. Напротив, 70% не-CP-AMPA нейронов быстро восстанавливали $[Ca^{2+}]_i$ до исходного уровня даже после повторного воздействия глутамата, то есть относились преимущественно к первой группе.

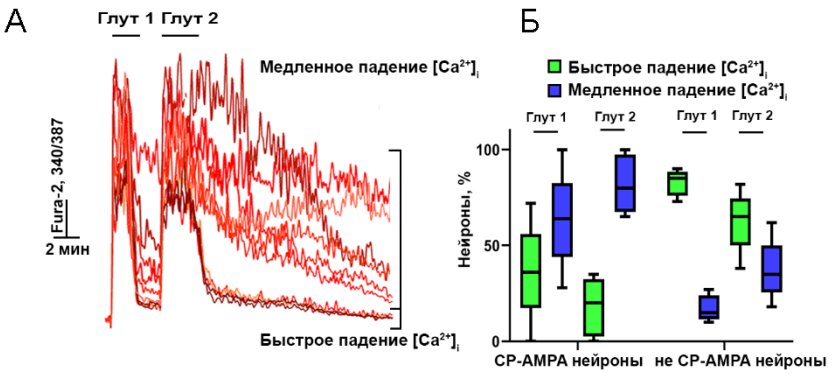


Рис. 2. (А) Реакция СР-АМРА нейронов на повторные аппликации 10 мкМ глутамата. (Б) Диаграмма, отражающая количество с быстрым и медленным падением $[Ca^{2+}]_i$ после отмывки глутамата среди СР-АМРА и не-СР-АМРА нейронов.

Вклад ионных каналов в ответ СР-АМРА нейронов. Применение NASPM (антагониста СР-AMPAR) значительно снижало агонист-индуцированное повышение $[Ca^{2+}]_i$ в СР-АМРА нейронах, при этом неожиданно увеличивая кальциевый ответ в не-СР-АМРА нейронах (рис. 3), что может указывать на участие СР-АМРА нейронов в реализации ГАМКергического торможения, которое ослабевает при блокаде СР-AMPAR.

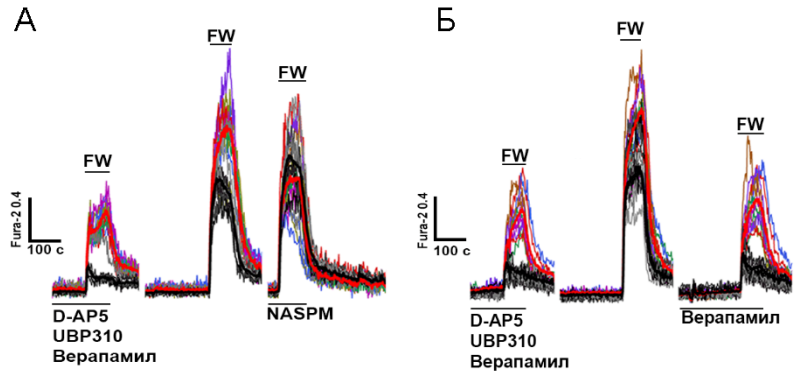


Рис. 3. Вклад СР-АМРА-рецепторов (А) и потенциал-зависимых кальциевых каналов (Б) в индуцируемый агонистом АМРА-рецепторов, FW, повышение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах. Чёрные кривые соответствуют ответам не-СР-АМРА нейронов, цветные кривые – ответам СР-АМРА нейронов.

Потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC) также вносили значительный вклад в кальциевые ответы. Их блокада верапамилом почти вдвое снижала ответ в CP-AMPA нейронах и практически полностью устраняла его в не-CP-AMPA нейронах при применении агониста AMPA-рецепторов. Антагонист ГАМК(А)-рецепторов и блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов не оказывали существенного влияния на ответ.

Динамика внутриклеточных ионов в различных нейрональных популяциях. При селективной активации AMPA-рецепторов CP-AMPA нейроны показывали устойчивое повышение $[Ca^{2+}]_i$, в то время как не-CP-AMPA нейроны демонстрировали только транзиентное изменение концентрации Ca^{2+} (рис. 4).

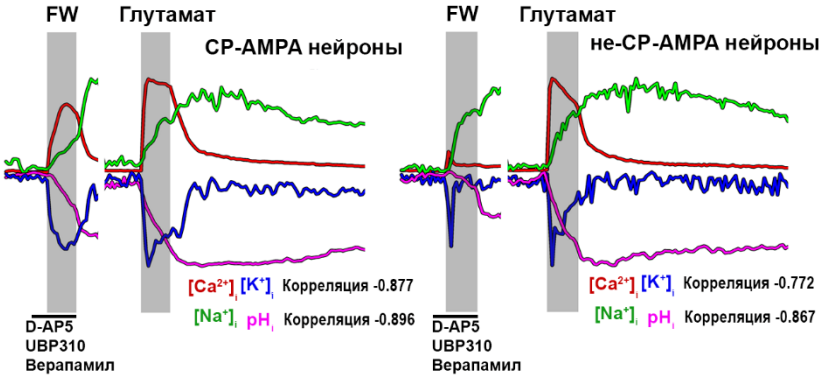


Рис. 4. Усреднённые кинетики изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, Na^+, K^+ и H^+ в CP-AMPA и не-CP-AMPA нейронах при аппликации FW и глутамата.

Повышение $[Na^+]_i$ было значительно выше в не-CP-AMPA нейронах по сравнению с CP-AMPA нейронами. $[K^+]_i$ существенно снижалась только в CP-AMPA нейронах, обратно коррелируя с изменениями $[Ca^{2+}]_i$. Цитозольное закисление происходило в обоих типах нейронов, но с различной кинетикой. Нами также было отмечено, что паттерны восстановления внутриклеточной концентрации изучаемых ионов также различались. $[Ca^{2+}]_i$ и $[K^+]_i$ восстанавливались быстрее, чем $[Na^+]_i$ и pH. Была обнаружена сильная отрицательная корреляция между динамикой $[Ca^{2+}]_i$ и $[K^+]_i$. Изменения $[Na^+]_i$ и pH также были сильно скоррелированы, что указывает на участие Na^+/H^+ обменников [8]. Усиленный приток кальция в CP-AMPA нейроны, вероятно, объясняет их повышенную чувствительность к эксайтотоксическому повреждению. Кроме того, наличие CP-AMPAR, по-видимому, способствует высвобождению

ГАМК [9], наделяя эти нейроны важными регуляторными функциями, но одновременно делая их более восприимчивыми к эксайтотоксичности.

Заключение. Исследование показывает, что CP-AMPA нейроны имеют уникальные характеристики регуляции ионов: более высокий приток Ca^{2+}, более низкий приток Na^+ и кальций-зависимый отток K^+ по сравнению с не-CP-AMPA нейронами. Обратная корреляция между $[Na^+]_i$ и pH предполагает, что выявленные изменения ионного гомеостаза, помимо кальциевой перегрузки, вносят вклад в эксайтотоксическое повреждение.

В то время как большинство исследований эксайтотоксичности фокусируется на кальциевой перегрузке, это исследование подчёркивает важность учёта нарушений гомеостаза Na^+, K^+ и H^+. Будущие терапевтические подходы должны потенциально быть направлены на комплексное восстановление ионного гомеостаза, а не исключительно на предотвращение притока Ca^{2+}.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 25-25-00424.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells // Frontiers in cellular neuroscience. 2020. 14. C. 51.
2. Barker-Haliski M., White H. S. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015. 5. № 8. a022863.
3. Frankowski J. C., Kim Y. J., Hunt R. F. Selective vulnerability of hippocampal interneurons to graded traumatic brain injury // Neurobiology of disease. 2019. 129. C. 208-216.
4. Gao X., Deng-Bryant Y., Cho W., Carrico K. M., Hall E. D., Chen J. Selective death of newborn neurons in hippocampal dentate gyrus following moderate experimental traumatic brain injury // Journal of neuroscience research. 2008. 86. № 10. C. 2258-2270.
5. Nichols J., Bjorklund G. R., Newbern J., Anderson T. Parvalbumin fast-spiking interneurons are selectively altered by paediatric traumatic brain injury // The Journal of physiology. 2018. 596. № 7. C. 1277–1293.
6. Zinchenko V. P., Dolgacheva L. P., Tuleukhanov S. T. Calcium-permeable AMPA and kainate receptors of GABAergic neurons // Biophysical reviews. 2024. 16. № 2. C. 165–171.
7. Gaidin S. G., Kosenkov A. M., Zinchenko V. P., Kairat B. K., Malibayeva A. E., Tuleukhanov S. T. Identification of Neurons Containing Calcium-Permeable AMPA and Kainate Receptors Using Ca2+ Imaging // Bio-protocol. 2025. 15. № 3. e5199.
8. Verma V., Bali A., Singh N., Jaggi A. S. Implications of sodium hydrogen exchangers in various brain diseases // Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. 2015. 26. № 5. C. 417-426.
9. Zanetti L., Regoni M., Ratti E., Valtorta F., Sassone J. Presynaptic AMPA Receptors in Health and Disease // Cells. 2021. 10. № 9.in Health and Disease // Cells. 2021. 10. № 9.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА И ДЕГРАДАЦИИ 2-АРАХИДОНОИЛГЛИЦЕРИНА И АНАНДАМИДА КАК СПОСОБ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ С РАЗНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ

Тарасова Е.О., Богачева П.О., Абрарова Г.Ф., Балезина О.П.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Эндоканнабиноидная (ЭК) система широко известна как система ретроградной регуляции синаптической активности, работа которой важна для тонкой подстройки процессов выделения медиатора из пресинаптических окончаний и функционального состояния постсинаптических структур [1,2]. В последнее время число соединений, относящихся к ЭК системе, заметно увеличилось, однако до сих пор не утрачивается интерес к двум классическим представителям ЭК – 2-арахадиноилглицерину (2-АГ) и арахидонилэтаноламину (АЭА, или анандамид). В нашей лаборатории было обнаружено потенцирующее действие 2-АГ и АЭА на секрецию ацетилхолина в моторных синапсах мыши [3-5]. Можно предполагать и возможность эндогенной выработки и действия этих ЭК в периферических синапсах, поскольку в скелетных мышцах были описаны ферменты синтеза и деградации ЭК [6]. За синтез 2-АГ, как известно, отвечает диацилглицеринлипаза (ДАГЛ), а деградируется этот ЭК со стороны моноацилглицеринлипазы (МАГЛ). Для АЭА имеются собственные ферменты синтеза и деградации, а именно, NAPE-зависимая фосфолипаза D (NAPE-ФЛД) и гидролаза амидов жирных кислот (ГАЖК), соответственно.

Для изучения влияния эндогенно вырабатывающихся 2-АГ и АЭА в синапсах центральной нервной системы (ЦНС), а также в других структурах, как правило, используется фармакологическое ингибирование ферментов деградации [7-9], а иногда и ферментов синтеза этих ЭК [10]. При ингибировании фермента деградации происходит накопление соответствующего ЭК в синаптической щели, в результате чего может происходить активация каннабиноидных (СВ) и других рецепторов, приводящая к изменению синаптической активности. В моторных синапсах млекопитающих до сих пор не было изучено влияние изменения активности ферментов синтеза и деградации ЭК на секрецию АХ. В связи с этим, целью данной работы было проследить влияние ингибирования ферментов синтеза и деградации 2-АГ, а также АЭА на спонтанную и вызванную электрической стимуляцией активности в зрелых моторных синапсах диафрагмы мыши и в новообразованных после травмы двигательного нерва синапсах мышцы длинного разгибателя пальцев (*m. EDL*).

Методика. Для исследования вызванной и спонтанной секреции АХ в моторных синапсах использовались препараты диафрагмы (*m. diaphragma - n. phrenicus*) и мышцы длинного разгибателя пальцев (*m. EDL n. peroneus*) мышей линии BALB/c. Для моделирования новообразованных синапсов за 11 дней до эксперимента проводили передавливание веточки *n. peroneus*, иннервирующей m. EDL, после чего мыши возвращались в домашнюю клетку и содержались в виварии с соблюдением всех правил комисси МГУ по биоэтике. Операция по передавливанию нерва проводилась под изофлюрановым наркозом и с использованием лидокаина в качестве местного обезболивающего в области хирургического воздействия. В день эксперимента животное эфтанизировали путём быстрой декапитации и полученный препарат помещали в камеру объемом 3 мл. В течение всего эксперимента препарат перфузировали оксигенированным (95% O_2, 5% CO_2) раствором Лайли (pH 7.2-7.4), содержащим (мМ): NaCl – 135, KCl – 4, NaH_2PO_4 – 0.9, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 1, $NaHCO_3$ – 16.3, глюкоза – 11. Регистрация миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных короткой ритмической стимуляцией двигательного нерва (50 Гц, 1 сек) потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществлялась при помощи стандартной микроэлектродной техники. Микроэлектроды изготавливались из боросиликатного стекла (Институт биологического приборостроения РАН, Пущино) при помощи пуллера MP-500 (RWD Life Sciences, Китай). В случае исследования вызванной активности синапсов мышечные волокна предварительно рассекали для предотвращения их сокращения. Для изучения только спонтанной секреции АХ процедура рассечения мышечных волокна не проводилась.

Сигналы регистрировали при помощи Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments, USA) 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” (Synaptosoft). В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. Помимо определения средних значений амплитуд МПКП и ПКП, производили оценку квантового состава ПКП (отношение средней корректированной на нелинейную суммацию амплитуды ПКП к средней амплитуде МПКП). Достоверность различий между выборками оценивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA), t-критерию Стьюдента и по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. При ингибировании фермента синтеза 2-АГ (ДАГЛ) при помощи DO34 (1 мкМ) не происходило достоверных изменений амплитуды, а также частоты МПКП ни в зрелых, ни в новообразованных синапсах. Не изменялись также и показатели

вызванной активности синапсов. Ни амплитуда ПКП, ни их квантовый состав при действии DO34 не отличались от контрольных значений. Таким образом, ингибирование фермента синтеза 2-АГ не приводит к выраженным изменениям активности моторных синапсов. Однако, данный результат не является показателем принципиального отсутствия эндогенно действия 2-АГ в нервно-мышечных синапсах. При активной деградации 2-АГ со стороны МАГЛ изменение интенсивности его выработки могло и не сказаться на секреции АХ. Действительно, ингибирование фермента деградации 2-АГ, а именно МАГЛ, приводило к значимым изменениям амплитуды, но не квантового состава ПКП. На фоне ингибитора МАГЛ JZL184 (1 мкМ) наблюдался прирост амплитуды каждого ПКП в залпе на 55% в зрелых синапсах диафрагмы мыши. Аналогичный прирост амплитуды ПКП был обнаружен и в новообразованных синапсах m.EDL (рис. 1 В, Д) при действии JZL184. И в том, и в другом случае увеличние амплитуды мультиквантового ПКП обуславливался приростом амплитуды МПКП. В то же время, в случае изучения исключительно спонтанной секреции АХ (то есть, в отсутствие электрической стимуляции нерва), на фоне JZL184 не происходило изменения секреции АХ (рис. 1 А, Б). Тем самым, можно утверждать, что эндогенная выработка 2-АГ способна происходить в нервно-мышечных синапсах разного функционального статуса при их работе в режиме кратковременной залповой активности. В покое же эндогенной выработки либо не происходит, либо она не достаточна для оказания выраженного влияния на секрецию медиатора. Примечательно, что эффекты, наблюдающиеся при ингибировании фермента деградации 2-АГ, совпадают с действием экзогенного 2-АГ и также приводят к потенциации нервно-мышечной передачи [3,4].

Что касается АЭА, то ингибирование его фермента синтеза (NAPE-PLD) при помощи ARN19874 (50 мкМ) не привело к изменению спонтанной или вызванной секреции в моторных синапсах мыши.

Однако ингибирование ГАЖК, фермента деградации АЭА, вызывало изменение секреции АХ даже в покоящихся моторных синапсах мыши. При ингибировании ГАЖК при помощи URB597 (1 мкМ) наблюдалось увеличение как амплитуды, так и частоты МПКП (рис 2 А, Б). Выраженно изменялась на фоне URB597 и вызванная секреция АХ: на фоне прироста амплитуды спонтанных МПКП происходил прирост амплитуды ПКП, а квантовый состав оставался на уровне контрольных значений. Данное действие URB597 отличалось от эффектов экзогенной аппликации АЭА [3,4], вызывавшего прирост только частоты, но не амплитуды МПКП и приводившего к увеличению как амплитуды, так и квантового состава ПКП. В новообразованных синапсах *m. EDL* действие экзогенного АЭА вызывало, в отличие от зрелых нервно-мышечных

синапсов, снижение секреции АХ в виде уменьшения амплитуды и квантового состава ПКП. На фоне URB597 происходило падение только квантового состава ПКП, но не их амплитуды, поскольку наблюдался параллельный прирост амплитуды МПКП.

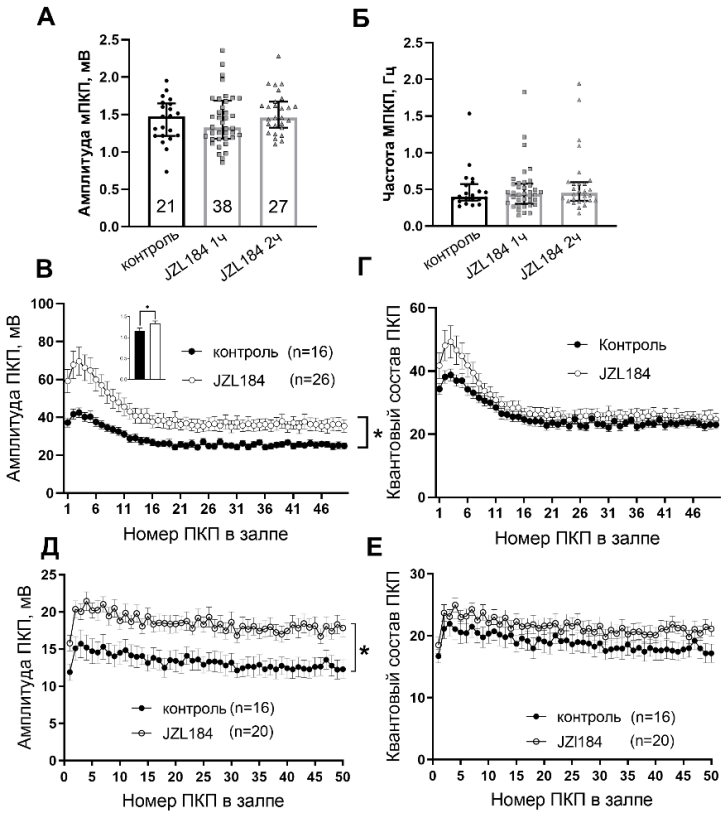


Рис. 1. Влияние ингибирования фермента деградации 2-АГ (МАГЛ) на спонтанную и вызванную активность зрелых нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши (А-Г) и новообразованных синапсов *m. EDL*. А. Амплитуда МПКП в контроле и на фоне действия JZL184 (1 мкМ) Б. Частота МПКП в контроле и при действии JZL184 В. Амплитуда ПКП в контроле и на фоне действия JZL184. На врезке – амплитуда МПКП. Г. Квантовый состав ПКП в контроле и на фоне действия JZL184 Д. Амплитуда ПКП в контроле и на фоне действия JZL184 в новообразованных синапсах. Е. Квантовый состав ПКП в контроле и на фоне действия JZL184 в новообразованных синапсах * – $p<0,05$

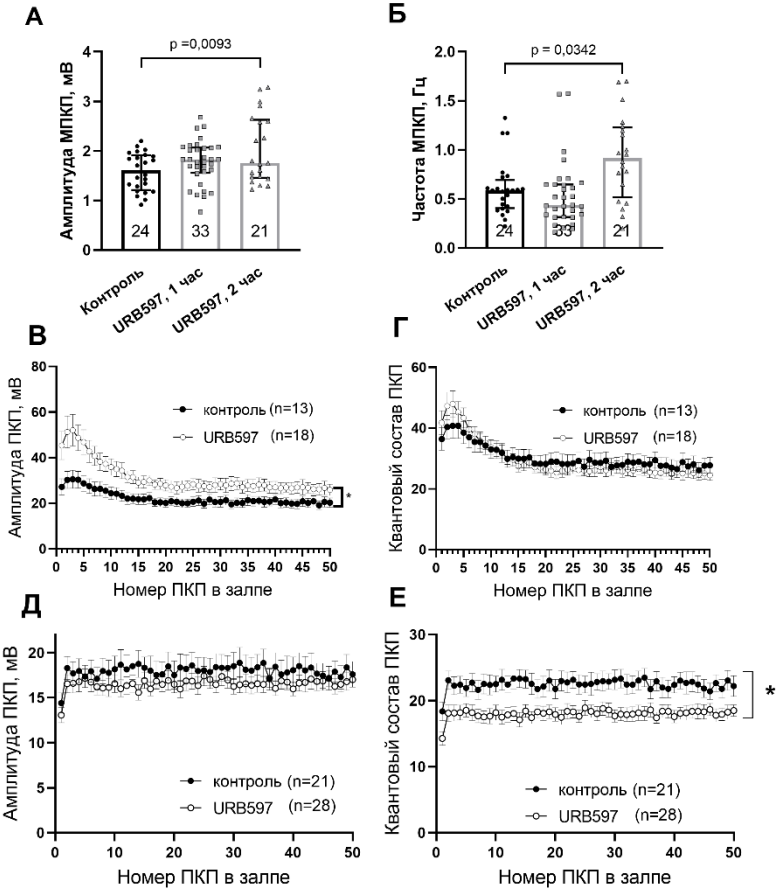


Рис. 2. Влияние ингибирования фермента деградации АЭА (ГАЖК) на спонтанную и вызванную активность зрелых нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши (А-Г) и новообразованных синапсов *m. EDL*. А. Амплитуда МПКП в контроле и на фоне действия URB597 (1 мкМ) Б. Частота МПКП в контроле и при действии URB597 В. Амплитуда ПКП в контроле и на фоне действия URB597; * – $p<0,05$ Г. Квантовый состав ПКП в контроле и на фоне действия URB597 Д. Амплитуда ПКП в контроле и на фоне действия URB597 в новообразованных синапсах. Е. Квантовый состав ПКП в контроле и на фоне действия URB597 в новообразованных синапсах

Таким образом, изменение активности ферментов синтеза 2-АГ и АЭА не сказывается на работе нервно-мышечных синапсов мыши, в то время как ингибирование деградации этих ЭК приводит к изменению секреции АХ как в зрелых, так и в новообразованных синапсах. Ингибирование МАГЛ повторяет действие экзогенного 2-АГ, а на фоне ингибирования ГАЖК наблюдаются эффекты, отличные от действия экзогенного АЭА.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-25-00065

ЛИТЕРАТУРА

1. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):9-29. doi:10.1038/s41582-019-0284-z
2. Balezina OP, Tarasova EO, Bogacheva PO. Myogenic Classical Endocannabinoids, Their Targets and Activity. *Biochem Mosc*. 2024;89(10):1759-1778. doi:10.1134/S0006297924100080
3. Tarasova EO, Khotkina NA, Gaydukov AE, Balezina OP. Spontaneous Acetylcholine Release Potentiation Induced by 2-Arachidonoylglycerol and Anandamide in Mouse Motor Synapses. *Mosc Univ Biol Sci Bull*. 2021;76(1):1-6. doi:10.3103/S0096392521010053
4. Tarasova EO, Khotkina NA, Bogacheva PO, Chernyshev KA, Gaydukov AE, Balezina OP. Noncanonical Potentiation of Evoked Quantal Release of Acetylcholine by Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Mouse Motor Synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol*. 2021;15(4):395-405. doi:10.1134/S199074782106012X
5. Tarasova E, Bogacheva P, Chernyshev K, Balezina O. Quantal size increase induced by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol requires activation of CGRP receptors in mouse motor synapses. *Synapse*. 2024;78(1):e22281. doi:10.1002/syn.22281
6. Crespillo A, Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, et al. Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem J*. 2011;433(1):175-185. doi:10.1042/BJ20100751
7. Morsch M, Protti DA, Cheng D, et al. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission. *Sci Rep*. 2018;8(1):4685. doi:10.1038/s41598-018-22888-4
8. Colangeli R, Pierucci M, Benigno A, Campiani G, Butini S, Di Giovanni G. The FAAH inhibitor URB597 suppresses hippocampal maximal dentate afterdischarges and restores seizure-induced impairment of short and long-term synaptic plasticity. *Sci Rep*. 2017;7(1):11152. doi:10.1038/s41598-017-11606-1
9. Martínez-Rivera A, Fetcho RN, Birmingham L, et al. Elevating levels of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol blunts opioid reward but not analgesia. *Sci Adv*. 2024;10(48):eadq4779. doi:10.1126/sciadv.adq4779
10. Wilkerson JL, Donvito G, Grim TW, et al. Investigation of Diacylglycerol Lipase Alpha Inhibition in the Mouse Lipopolysaccharide Inflammatory Pain Model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;363(3):394-401. doi:10.1124/jpet.117.243808

Внеклеточные везикулы и межклеточная коммуникация

ДОБАВЛЕНИЕ К КУЛЬТУРАЛЬНЫМ СРЕДАМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ У ЧЕЛОВЕКА

Ахмедова З.Ф., Сысоева А.П., Гаврилов М.Ю., Зингеренко Б.В., Шевцова Ю.А., Силачев Д.Н., Непша О.С., Макарова Н.П., Кулакова Е.В., Калинина Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Современные исследования показывают, что внеклеточные везикулы (ВВ), выделенные из биологических жидкостей репродуктивных органов и тканей, могут улучшить результаты вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у животных. Например, ВВ, выделенные из фолликулярной жидкости (ФЖ), могут улучшить качество ооцитов, увеличивая их способность к оплодотворению и развитию эмбрионов [1]. ВВ, выделенные из спермы, могут повысить подвижность и способность сперматозоидов к оплодотворению [2,3].

Добавление ВВ в культуральные среды улучшает условия для развития эмбрионов, что повышает их качество и увеличивает вероятность успешной имплантации [4-6]. На животных моделях получены обнадеживающие результаты по оптимизации условий культивирования in vitro, что дало нам повод использовать данные технологии для человека.

Цель. Оценить эмбриологические и клинические результаты оптимизации эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ с помощью сокультивирования ВВ ФЖ с эмбрионами у пациенток с множественными неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения.

Материалы и методы. Набор пациенток проходил в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова. Настоящее исследование было одобрено на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 10 от 20.10.2022, председатель комиссии д.м.н. Воронов Д.В.).

В исследовании приняли участие 76 женщин из супружеских пар с более чем двумя неудачными попытками ЭКО, нормальным кариотипом и слабо выраженной патозооспермией. Стандартный протокол ВРТ включал

забор ФЖ в день трансвагинальной пункции для выделения ВВ методом ультрацентрифугирования. Ооциты после оплодотворения были случайным образом разделены на две группы: группа 1 – сокультивирование зигот с ВКВ ФЖ в течение 24 часов, группа 2 – классическое культивирование. Добавление ВКВ ФЖ проводилось следующим образом: в лунку с 0,3 мл культуральной среды и ооцитами после ИКСИ добавляли 2 мкл среды с ВКВ ФЖ и оставляли на 24 часа. На 1-й день культивирования зиготы группы 1 переносились в классическую культуральную среду для дальнейшего развития до бластоцисты. Оценка эмбриологических и клинических результатов проводилась с конечной точкой – частотой наступления беременности после переноса одного эмбриона в полость матки. Статистический уровень значимости был установлен $p<0,05$.

Результаты. При оценке параметров раннего эмбриогенеза было установлено, что частота оплодотворения была значительно выше в группе, где ооциты сокультивировались с ВКВ ФЖ, составив 88,1% против 77,3% ($p<0,001$, хи-квадрат). В группе 1 также была значительно выше частота формирования бластоцист отличного и хорошего качества, 55,0% против 42,6% ($p<0,01$). При сокультивировании оплодотворенных ооцитов после ИКСИ с ВКВ ФЖ значительно увеличивается количество бластоцист, пригодных для переноса в полость матки и криоконсервации (медиана: 1 [0;1,25] в группе 1 против 0 [0;1] в группе 2).

Анализ клинических данных показал, что частота наступления беременности эмбрионами из группы 2 составила 27,2%. В группе 1 (с ВКВ ФЖ) клиническую беременность диагностировали у 14 женщин из 45 переносов, а биохимическую – у двух. Частота наступления клинической беременности в группе 1 составила 31,1%.

Как видно из данных, статистически значимой разницы по клиническим показателям между группами в общей когорте женщин с множественными неудачными попытками ЭКО не обнаружено. Однако анализ клинических исходов выявил тенденцию к увеличению частоты наступления беременности при сокультивировании ВВ ФЖ у более молодых женщин и почти полное отсутствие положительного исхода у женщин позднего репродуктивного возраста.

Таким образом, можно говорить о том, что добавление ВВ ФЖ к культуральным средам может улучшить результаты вспомогательных репродуктивных технологий за счет улучшения качества ооцитов, повышения эффективности оплодотворения. Необходимо проводить дальнейшие исследования, чтобы понимать, происходит ли улучшение качества эмбрионов, меняется ли регуляция генной экспрессии и снижается ли риск анеуплоидии в эмбрионах на преимплантационном этапе развития. Это открывает новые перспективы для оптимизации программ лечения бесплодия и повышения успеха ВРТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee SH. The role of extracellular vesicles in embryo development: implications for reproductive health and therapeutic potential. Reprod Fertil Dev. 2025 Mar;37:RD24151. doi: 10.1071/RD24151. PMID: 40153376.
2. Sysoeva AP, Makarova NP, Silachev DN, Lobanova NN, Shevtsova YA, Bragina EE, Kalinina EA, Sukhikh GT. Influence of Extracellular Vesicles of the Follicular Fluid on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm. Bull Exp Biol Med. 2021 Dec;172(2):254-262. doi: 10.1007/s10517-021-05372-4. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34855079.
3. Патент № 2801339 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, A61B 17/435. Способ использования внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для увеличения подвижности сперматозоидов человека в программах экстракорпорального оплодотворения : № 2022131353 : заявл. 01.12.2022 : опубл. 07.08.2023 / А. П. Сысоева, Н. П. Макарова, Д. Н. Силачев [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN NQTCCG.
4. Saadeldin IM, Pavani KC, Gnagnarelli J, Ehab S, Assiri AM, Van Soom A. Unlocking a Decade of Research on Embryo-Derived Extracellular Vesicles: Discoveries Made and Paths Ahead. Stem Cell Rev Rep. 2025 Apr;21(3):698-708. doi: 10.1007/s12015-025-10844-5. Epub 2025 Jan 22. PMID: 39841368.5
5. Characteristics of the Follicular Fluid Extracellular Vesicle Molecular Profile in Women in Different Age Groups in ART Programs / A. Sysoeva, Z. Akhmedova, O. Nepsha [et al.] // Life. – 2024. – Vol. 14, No. 5. – DOI 10.3390/life14050541. – EDN SZVYVN.
6. Ducarre S, Chiechio RM, Moulin G, Butera E, Dupont A, Penno C, El Amrani A, Heichette C, Even-Hernandez P, Marchi V, Ravel C. Extracellular Vesicles From Follicular Fluid in Infertile Women: Size, Morphology and miRNA Content Analysis. J Extracell Biol. 2025 Mar 5;4(3):e70041. doi: 10.1002/jex2.70041. PMID: 40052100; PMCID: PMC11881956.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДАХ, СОКУЛЬТИВИРОВАННЫХ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ ДОНОРА

Гаврилов М.Ю.[1], Макарова Н.П.[1], Сысоева А.П.[1], Жучков В.А.[2], Чернышев В.С.[1], Калинина Е.А.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Введение. Изучение экспрессии генов в мужских гаметах позволяет глубже понять, какие гены и белки участвуют в важнейших процессах, таких как мейоз, сперматогенез и активация сперматозоидов. Это помогает идентифицировать ключевые факторы, которые могут быть нарушены при мужском бесплодии. Особенно важно понимание биологических процессов для повышения эффективности экстракорпорального оплодотворения. Криоконсервация сперматозоидов является на сегодняшний день рутинной процедурой, однако не утихают споры о ее влиянии на сами мужские половые клетки, так и на здоровье рожденных детей при использовании размороженных сперматозоидов. Показаны механические и морфологические нарушения у сперматозоидов, связанные с процессом криоконсервации [1]. Именно поэтому ведутся разработки комплексных добавок в растворы криопротекторов для увеличения криотолерантности клеток [2,3]. Одной из таких добавок может служить семенная плазма, состав которой позволяет защитить сперматозоиды от осмотического шока. нако как показывают исследования, состав семенной плазмы зависит от соматических заболеваний мужчины и показателей подвижности сперматозоидов [4,5]. Более того, семенная плазма мужчин часто содержит бактериальные и вирусные компоненты, которые при попытке донации могут оказывать негативное влияние на мужские половые клетки [5]. Поэтому нами была предпринята попытка использовать внеклеточные везикулы (ВВ), выделенные из семенной плазмы (СП).

В литературе опубликовано достаточно большое число работ, посвященных изучению как самой СП, так и ВВ СП [7,8]. Целью настоящего исследования была оценка профиля экспрессии генов в сперматозоидах человека, сокультивированных с ВВ СП донора, до и после процедуры криоконсервации.

Материалы и методы. Исследование проходило на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор академик РАН, проф., д.м.н. Сухих Г.Т., Москва, Россия) и было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол №10 от 20.10.2022, председатель комиссии д.м.н. Воронов Д.В.). Были получены образцы эякулята от 17 мужчин путем мастурбации после 2-3 дней полового воздержания. После 30 минут разжижения на вращающейся платформе был проведен подсчет показателей эякулята, включающий концентрацию, подвижность и морфологию сперматозоидов. Расчет проводили с использованием системы компьютерного анализа CASA. После анализа показателей эякулята было проведено центрифугирование в градиенте плотностей для выделения фракции подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов в культуральных средах согласно инструкции производителя (ПанЭКО, Россия). Выделение ВВ из СП официального донора спермы проводили методом ассиметричной глубинной фильтрации в соответствии с протоколом производителя картриджей, включающего стадию отмывки от клеточной фракции и последующее пропускание через полупроницаемую мембрану («Простагност», Москва, Россия). После выделения ВВ СП хранили при температуре -80оС в лабораторном холодильнике до момента использования, не допуская повторной разморозки.

Криоконсервацию сперматозоидов выполняли строго согласно инструкции производителя сред SpermFreeze (FertiPro, Бельгия). Кратко, покапельно добавляли криопротектор к сперматозоидам соотношении 4:6. В течении 10 мин перемешивали криопротектор с суспензией клеток на вращающейся платформе, далее аликвоту помещали в крионоситель (криосоломина, CryoBIOSYSTEM США), который на 40 минут погружали в пары жидкого азота с последующим помещением криосоломины в жидкий азот на температуру -196оС. Размораживание осуществляли с использованием культуральных сред для сперматозоидов SpermRINSE (Витролайф, Швеция). Отмывали криопротектор путем центрифугирования в течение 10 мин при 1 900 об/мин. Конечный объем аликвоты составлял 1 мл.

После обработки эякулята в градиенте плотностей каждый образец разделяли на 3 группы: группа 1 – аликвота без криоконсервации после отмывки (начальная точка); группа 2 – аликвота с криоконсервацией и последующим размораживанием; группа 3 – аликвота с сокультивированием с ВВ СП донора, криоконсервацией и последующим размораживанием. Для всех групп оценивали показатели жизнеспособности сперматозоидов, как до, так и после размораживания.

Образцы группы 3 в течении 1 часа при комнатной температуре сокультивировали с ВВ СП донора до криоконсервации. Добавляли суспензию ВВ СП в объеме 100 мкл к 300 мкл сперматозоидов. Сперматозоиды группы 2 в течение этого часа также находились при комнатной температуре, в идентичных условиях.

Выделение суммарной РНК производилось методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора ExtractRNA (Евроген, Россия, #BC032) согласно инструкции производителя. Полученные препараты РНК после экстракции хранились в водном растворе при температуре -75°C. Реакция ревертирования осуществлялась с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия, #SK021) согласно инструкции производителя. Для реакции использовалось максимально возможное по протоколу количество РНК. Реакция проводилась в течение 1 часа при 37°C. Полученные препараты кДНК хранились при -20°C до момента использования. Для оценки содержания ВВ СП и их размеров выполняли с помощью трекового анализа частиц (Nanoparticle Tracking Analysis). Для постановки реакции ПЦР в реальном времени использовалась HS Taq ДНК полимераза (Евроген, Россия, #PK017H). Реакция для каждого образца производилась одновременно со всеми парами подобранных праймеров (включая контрольные) для правильной оценки уровня экспрессии генов относительно разных образцов. Реакция производилась в 20 мкл, концентрация праймеров составляла 0,5 мкМ. В качестве флуоресцентного красителя нуклеиновой кислоты был использован 20X EvaGreen® Dye (Biotium, США, #31000). Реакция с каждым праймером производилась в трёх повторах для получения наиболее достоверного результата. Была изучена экспрессия следующих генов: ATP1B1, AURKA, B2M, CACNA1C, DNAH2, GMCL1, GUSB, HSPA4L, KLHL10, PGK2, PRM1, SEPT2, SPATA18 и TEX11.

Результаты. После выделения ВВ СП донора был проведен анализ траекторий частиц для подтверждения присутствия ВВ СП. Результат показан на рисунке 1. Средний размер ВВ, выделенных методом ассиметричной глубинной фильтрацией, составил 80 нм, это наиболее представленная фракция ВВ с СП донора. Показатели эякулята, образцы которых использовали в работе, показаны в таблице 1. Как видно, в исследовании участвовали мужчины в основном с тератозооспермией. Сокультивирование сперматозоидов с ВВ СП достоверно не изменило параметры эякулята после размораживания, была обнаружена тенденция к сохранению прогрессивно-подвижной фракции. Полученные данные требуют подтверждения на большей выборке.

Результаты изменения экспрессии генов показаны в таблице 2. Как видно, статистически значимо изменяется экспрессия только двух генов – *AURKA* и *KLHL10*. Эти два гена являются критически важными для оплодотворения.

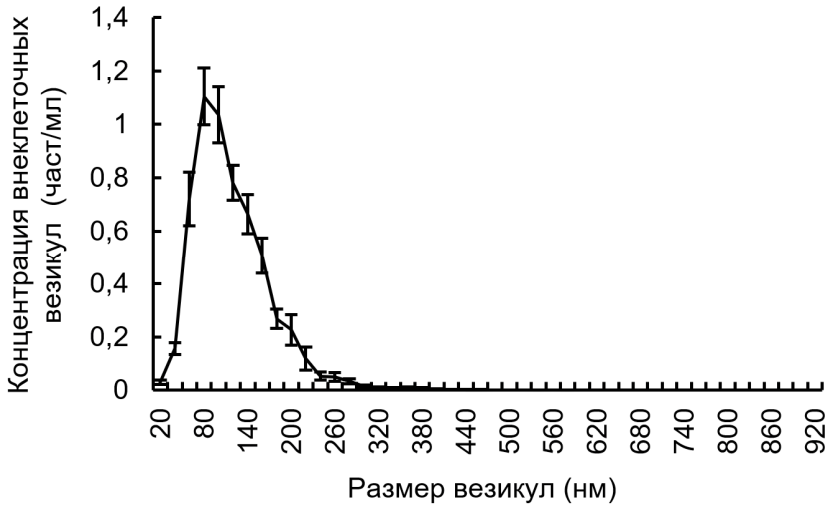


Рис. 1. Проведение анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis) внеклеточных везикул семенной плазмы официального донора спермы. Данные представлены как M±SD

Табл. 1. Показатели эякулята мужчин, образцы которых изучали в исследовании (Me (Q1;Q3))

Показатель	контроль n=17	без ВВ СП n=17	с ВВ СП n=17
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл . млн/мл	82 (57;100)	33 (22;44)	33 (26;60)
Прогрессивно подвижные сперматозоиды. %	67 (60; 73)	44 (26;58)	49 (38;70)
Морфологически нормальные сперматозоиды. %	3 (2;3)	3 (2;3)	3 (2;3)

Аврора-киназа А (*AURKA*) играет критическую роль в процессе деления клеток, особенно в контексте репродуктивной биологии. Нарушения в функционировании этого гена в сперматозоидах имеют значительные последствия для хромосомной сегрегации и эмбрионального развития. AURKA необходима для правильной организации и функционирования митотического веретена. При дисрегуляции активности AURKA нарушается полимеризация микротрубочек и их прикрепление к кинетохорам, что приводит к неправильному распределению хромосом во время деления. Ген KLHL10

же участвует в регуляции клеточной дифференциации сперматозоидов, обеспечивая правильное формирование и функционирование акросомы. Нарушение экспрессии KLHL10 может привести к снижению подвижности сперматозоидов, что является важным фактором для успешного оплодотворения.

Табл. 2. Изменение экспрессии генов в сперматозоидах после размораживания в контрольных точках

Наименование гена	**контроль n=17**	**без ВВ СП n=17**	**с ВВ СП n=17**	***p*-value (критерий Манна-Уитни)**
ATP1B1	28.83232	26.933739	27.9341	0.138967
AURKA	27.73628	25.938117	27.7505	*0.010996*
B2M	39.64721	40.131178	40.4228	0.438412
CACNA1C	37.68212	36.481013	37.0604	0.146738
DNAH2	35.07099	33.438852	34.3495	0.199372
GMCL1	41.14488	39.733228	40.4348	0.219176
GUSB	32.98397	31.211299	32.4745	0.124279
HSPA4L	37.84525	37.417217	38.1816	0.171769
KLHL10	36.03301	34.832146	35.4862	*0.044101*
PGK2	27.61033	26.36779	27.197	0.092407
PRM1	34.08193	36.74063	37.4715	0.199372
SEPT2	40.68915	39.756199	40.077	0.452023
SPATA18	33.6039	32.249315	32.7963	0.371753
TEX11	31.70395	30.002831	31.438	0.054619

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что сокультивирование сперматозоидов с ВВ СП до криоконсервации позволяет сохранить фертильность мужских гамет. Эти данные дают повод продолжить изучение влияния ВВ СП и разрабатывать новые подходы использования ВВ в репродуктивной медицине [9,10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Khalil WA, Hassan MAE, Hegazy MM, Fathy K, El-Harairy MA, Ismail AA, Alfattah MA, Sindi RA, Abdelnour SA. Effects of Curcumin Oil Nano-Emulsion on Buffalo Sperm Cryopreservation: Insights on Sperm Quality, Kinematic Parameters, Sperm Ultrastructure, Oxidative Stress, Apoptosis, Microbiota, and Molecular Docking Analysis and Fertilising Capacity. Reprod Domest Anim. 2025 Apr;60(4):e70062. doi: 10.1111/rda.70062. PMID: 40265647.
2. Ranjan R , Kumar M Animal Physiology and Reproduction Division, ICAR-Central Institute for Research on Goats, Mathura, UP-281122, India, Swain DK , Singh SP , Kharche SD , Singh MK , Chauhan MS . Iodixanol fortification in freezing extender protects sperm DNA damage and improves antioxidant capacity. Cryo Letters. 2025 May-Jun;46(3):207-212. PMID: 40168054.

3. Vasiee M , Agharahimi A , Khalili MA , Rahavian A , Aboutaleb N . Sperm biological characteristics improves when sperm preparation is done before cryopreservation in varicocele patients. Cryo Letters. 2025 May-Jun;46(3):176-185. PMID: 40168051.
4. Fraser L, Wasilewska-Sakowska K, Mogielnicka-Brzozowska M, Koziorowska-Gilun M. Antioxidant status of chromatographic fractions of boar seminal plasma (SP) and mitochondrial functions of SP-treated spermatozoa following cryopreservation. Pol J Vet Sci. 2025 Jan;28(1):165-169. doi: 10.24425/pjvs.2025.154025. PMID: 40135437.
5. Возможна ли донация семенной плазмы в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий? / М. Ю. Гаврилов, А. А. Бабаян, А. С. Якимова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2024. – № 8. – С. 31-39. – DOI 10.18565/aig.2024.76. – EDN QNQCAY.
6. Влияют ли половые контакты в цикле ЭКО/ИКСИ на толщину эндометрия при наличии иммуногормональных маркеров стресса в семенной плазме? / М. А. Николаева, А. А. Бабаян, А. С. Арефьева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2022. – № 10. – С. 103-114. – DOI 10.18565/aig.2022.10.103-114. – EDN QWRBAW.
7. Sharkey DJ, Lyons HE, Chan HY, Robertson SA. Seminal Fluid Interaction with Female Reproductive Tract Epithelial Cells: In Vitro Models for Human. Methods Mol Biol. 2025;2897:663-673. doi: 10.1007/978-1-0716-4406-5_45. PMID: 40202668.
8. Zhang X, Greve PF, Minh TTN, Wubbolts R, Demir AY, Zaal EA, Berkers CR, Boes M, Stoorvogel W. Extracellular vesicles from seminal plasma interact with T cells in vitro and drive their differentiation into regulatory T-cells. J Extracell Vesicles. 2024 Jul;13(7):e12457. doi: 10.1002/jev2.12457. PMID: 39007430; PMCID: PMC11247398.
9. Терапевтические возможности внеклеточных везикул в репродуктивной медицине / Е. Е. Краевая, Н. П. Макарова, А. П. Сысоева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 7. – С. 5-9. – DOI 10.18565/aig.2021.7.5-9. – EDN BGHHXW.
10. P-188 The effect of follicular fluid extracellular vesicles on motility and hyperactivation of human spermatozoa and differential miRNA levels depend on the woman's age / S. Anastasiya, O. Nepsha, N. Makarova [et al.] // Human Reproduction. – 2022. – Vol. 37, No. Supplement_1. – DOI 10.1093/humrep/deac107.181. – EDN ENPRRP.

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА АССИМЕТРИЧНОЙ ГЛУБИННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ

Гаврилов М.Ю., Багдасарян А.А., Макарова Н.П., Сысоева А.П., Зингеренко Б.В., Калинина Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Исследование внеклеточных везикул (ВВ) фолликулярной жидкости (ФЖ) является критически важным для понимания базовых механизмов репродукции у человека. Эти везикулы выполняют ключевую роль в передаче информации между клетками и оказывают значительное воздействие на процессы, связанные с овуляцией, оплодотворением и эмбриональным развитием [1-3]. ВВ ФЖ участвуют в регуляции процесса овуляции. Они могут содержать факторы, которые стимулируют или подавляют овуляцию, что важно для понимания и управления репродуктивными процессами [4]. ВВ ФЖ содержат молекулы, которые влияют на подвижность и способность сперматозоидов к оплодотворению. Кроме того, они могут передавать информацию, необходимую для правильного развития эмбриона и после оплодотворения [1]. Содержание и состав ВВ ФЖ могут служить биомаркерами для диагностики и прогнозирования мужского и женского бесплодия. Именно поэтому изучение ВВ ФЖ может способствовать разработке персонализированных подходов к лечению бесплодия, учитывая индивидуальные особенности каждого пациента. В связи с этим, важно разрабатывать новые подходы к выделению ВВ ФЖ. Н е обходимо сказать, что выбор оптимального метода для выделения ВВ является сложной задачей, так как различные методы разделения дают разные результаты при работе с одним и тем же образцом. Наиболее распространенным методом выделения ВВ является ультрацентрифугирование. Этот метод подходит для больших объемов образцов, но он трудоемкий, длительный и требует дорогостоящего оборудования, что может ограничивать его использование в клинических условиях. Кроме того, ультрацентрифугирование дает везикулы с низкой чистотой и целостностью, поэтому необходимо искать новые, более совершенные методы выделения ВВ ФЖ. Одним из таких методов является ассиметричная глубинная фильтрация. Показано ее эффективное

использование для сыворотки крови, кондиционной среды от мезенхимальных стволовых клеток и мочи [5]. Цель настоящего исследования – адаптация технологии асимметричной глубинной фильтрации для ФЖ.

Материалы и методы. Для тестирования метода асимметричной глубинной фильтрации были отобраны образцы ФЖ женщин, проходящих лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. Исследование одобрено на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол №10 от 20.10.2022, председатель комиссии д.м.н. Воронов Д.В.). Всего было использовано 4 аликвоты ФЖ по 10 мл, которые были разделены на две части. Первую часть использовали для выделения ВВ методом последовательного ультрацентрифугирования, как описано ранее [1,2]. Кратко, 400g×10 мин; 10 000g×30 мин при 4°C; 108 000 g согласно протоколу ISEV, осадок ресуспендировали в 100мкл PBS. Вторую часть отобранной ФЖ отдавали на выделение ВВ методом ассиметричной глубинной фильтрации на первом этапе в соответствии с протоколом производителя картриджей, включающего стадию отмывки от клеточной фракции и последующее пропускание через полупроницаемую мембрану («Простагност», Москва, Россия). Оценку содержания и размеров выделенных ВВ проводили по анализу трекинга частиц (NTA) с помощью Nanosight NS-300, оснащенного лазером мощностью 45 МВт с длиной волны 488 нм. В течение нескольких минут после разбавления образец вводили в испытательную ячейку, освещали лазером и записывали пять видеороликов продолжительностью 1 мин. на высокочувствительную камеру sCMOS с уровнем, установленным на 15, для фиксации движения частиц. Затем видеозаписи были проанализированы с помощью программного обеспечения Nanosight версии 3.2 с порогом обнаружения, равным 5, размером размытия и максимальным расстоянием скачка, установленным на авто, для определения концентрации EV и гидродинамического распределения по размерам. Далее сравнивали полученные кривые.

Результаты. На первом этапе выполнения работы мы столкнулись с множеством проблем, поскольку картриджы были не приспособлены выделению ВВ из такого объема ФЖ. Однако в результате был отработан протокол выделения ВВ ФЖ, который состоял в следующих шагах.

На первом этапе ФЖ в объеме 10 мл центрифугировали при 300 g для отделения клеточного компонента в течение 10 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость подвергали дальнейшей обработке на микроцентрифуге при 15 000 об/мин в течении 30 минут при комнатной температуре. Далее подготавливался картридж для глубинной

фильтрации, в большое отделение вводили 2 мл р-ра спирта в воде 50%, картридж помещался в 50мл пробирку и центрифугировался 10мин 400g, спирт смачивает мембрану и вытесняет пузырьки воздуха, которые являются помехой для глубинной фильтрации. Для отмывки от раствора спирта в малое отделение вводили 1,5 мл PBS (Gibco, США) и картридж центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, далее, образцы ФЖ разбавляли 1:10 раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, pH=7,4), до конечного объема 8-10 мл и вводили в основное отделение картриджа. Введенная проба затем центрифугировалась 30 мин при 400 g, далее добавляли 5 мл PBS и снова центрифугировали в течение 20 мин при 400 g для отделения застрявших белков на мембране. Для выделения искомых везикул с мембраны добавляли 200 мкл PBS в малое отделение картриджа и центрифугировали 10 мин при 400g. На втором этапе был выполнен анализ содержания ВВ ФЖ. Результаты проведения NTA одного и того же образца при разных методах выделения ВВ показаны на рисунках 1 и 2. Как видно из графиков, метод асимметричной глубинной фильтрации позволяет выделить фракцию ВВ меньшего размера и в меньшей концентрации, что является оптимальным вариантом для дальнейшего использования ВВ в практике. Ультрацентрифугирование позволяет выделять ВВ большого размера, что соответствует апоптотическим тельцам, часто не несущим регуляторные компоненты, требуемые в клинической работе.

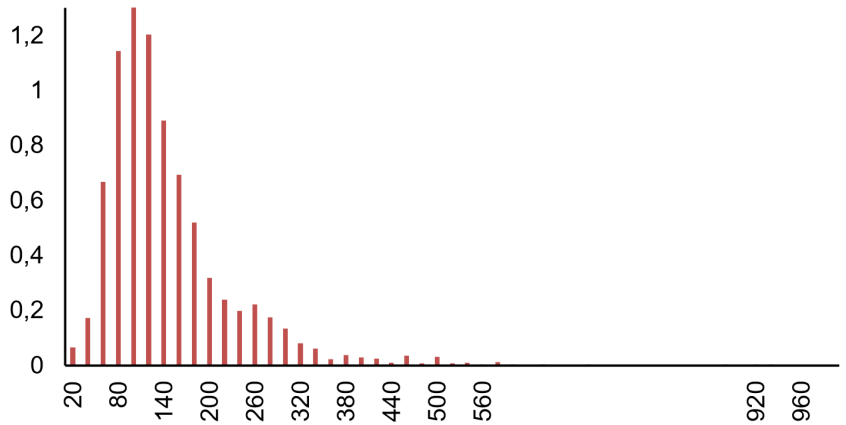


Рис. 1. ВВ ФЖ, выделенные методом последовательного ультрацентрифугирования.

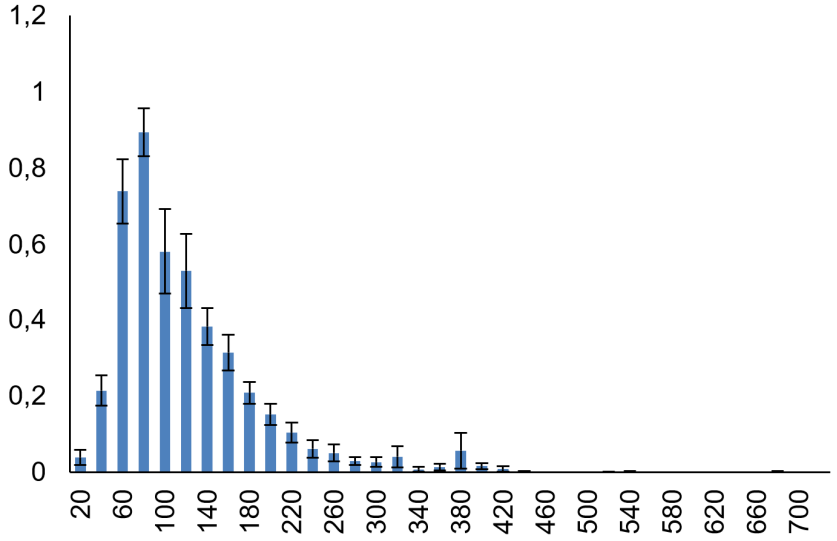


Рис. 2. ВВ ФЖ, выделенные методом асимметричной глубинной фильтрации.

Настоящее исследование является пилотным. Необходимо проведение дополнительных исследований ВВ, выделенных методом асимметричной глубинной фильтрации для сравнения их содержания и функциональности.

На сегодняшний день понятно, что изучение ВВ ФЖ является критически важным для понимания фундаментальных процессов репродукции у человека. Оно помогает раскрыть механизмы, управляющие развитием фолликулов, овуляцией, оплодотворением и эмбриональным развитием. Это знание может привести к разработке новых методов диагностики и лечения бесплодия, а также к улучшению результатов вспомогательных репродуктивных технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sysoeva AP, Makarova NP, Silachev DN, Lobanova NN, Shevtsova YA, Bragina EE, Kalinina EA, Sukhikh GT. Influence of Extracellular Vesicles of the Follicular Fluid on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm. Bull Exp Biol Med. 2021 Dec;172(2):254-262. doi: 10.1007/s10517-021-05372-4. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34855079.

2. Изменение транскрипции генов в клетках кумулюса возрастных женщин под действием внеклеточных везикул фолликулярной жидкости молодых доноров / Б. В. Зингеренко, О. В. Бурменская, А. П. Сысоева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178, № 12. – С. 767-773. – DOI 10.47056/0365-9615-2024-178-12-767-773. – EDN JFQBDJ.
3. Characteristics of the Follicular Fluid Extracellular Vesicle Molecular Profile in Women in Different Age Groups in ART Programs / A. Sysoeva, Z. Akhmedova, O. Nepsha [et al.] // Life. – 2024. – Vol. 14, No. 5. – DOI 10.3390/life14050541. – EDN SZVYVN.
4. Ducarre S, Chiechio RM, Moulin G, Butera E, Dupont A, Penno C, El Amrani A, Heichette C, Even-Hernandez P, Marchi V, Ravel C. Extracellular Vesicles From Follicular Fluid in Infertile Women: Size, Morphology and miRNA Content Analysis. J Extracell Biol. 2025 Mar 5;4(3):e70041. doi: 10.1002/jex2.70041. PMID: 40052100; PMCID: PMC11881956.
5. Chernyshev VS, Chuprov-Netochin RN, Tsydenzhapova E, Svirshchevskaya EV, Poltavtseva RA, Merdalimova A, Yashchenok A, Keshelava A, Sorokin K, Keshelava V, Sukhikh GT, Gorin D, Leonov S, Skliar M. Asymmetric depth-filtration: A versatile and scalable method for high-yield isolation of extracellular vesicles with low contamination. J Extracell Vesicles. 2022 Aug;11(8):e12256. doi: 10.1002/jev2.12256. PMID: 35942823; PMCID: PMC9451526.

ПРИМЕНЕИЕ ЭКЗОСОМ ПРОДУЦИРУЕМЫХ КОСТНОМОЗГОВЫМИ МСК ДЛЯ ТЕРАПИИ ОРДС

Есмагамбетов И.Б.[1], Грошева А.Г.[1], Рябова Е.И.[1,2], Прокофьев В.В.[1], Генкина Е.Н.[1]

[1]ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия
[2]ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА им. К.И. Скрябина», Москва, Россия

Введение. Острое повреждение лёгких (ОПЛ) и его наиболее тяжелое проявление – ОРДС – относятся к жизнеугрожающим состояниям. Большая часть экспертов признает малоэффективным использование существующих фармакологических методов лечения больных с ОРДС/ОПЛ [1,2]. В 2007 году J.Xu et al. было показано, что МСК, введенные мышам вместе с липополисахаридом (ЛПС) предотвращают, как ОПЛ, так и системный воспалительный ответ, снижая сывороточные уровни провоспалительных цитокинов [3].

Степень апоптоза трансплантируемых клеток является ограничивающим фактором применения МСК при ОПЛ [4,5]. Прекондиционирование МСК в условиях гипоксии увеличивает выживаемость вводимых клеток [6,7].

Р.К. Чайлахяном с соавторами было проведено исследование действия МСК, выращенных в условиях гипоксии и нормоксии, а также их секретома при введении крысам с ОРДС, вызванным введением ЛПС *Escherichia coli* (*E. coli*) [8]. Было показано, что терапевтический потенциал МСК, выращенных в условиях гипоксии, и их секретома выше, чем у клеток, культивированных в условиях нормоксии [9].

Позднее было показано, что в секретоме присутствуют частицы-экзосомы, осуществляющие горизонтальный перенос генетической информации и биологически активных молекул. Экспериментальные модели ОРДС на животных показали, что экзосомы продуцируемые МСК костного мозга улучшают состояние лёгких при ОРДС [10,11].

Целью данной работы являлось изучение возможности терапии ОРДС при помощи введения экзосом продуцируемых костномозговыми МСК на модели лабораторных животных.

Материалы и методы. Выделение МСК из костного мозга крыс и их культивирование проводилось как описано [8]. Для продукции экзосом, клетки в течении 48 часов культивировали на среде без добавления фетальной бычьей сыворотки. Экзосомы выделяли при помощи фильтрации культуральной жидкости через 0,22 нм, концентрировании

при помощи тангенциальной фильтрации с использованием кассеты 100 кДа. Сконцентрированный материал дополнительно очищали при помощи гель-фильтрации на колонке XK 26/100 (Cytiva, США), упакованной сорбентом Superdex 200 (Cytiva, США). Препараты экзосом были охарактеризованы при помощи NTA (Nano Sight, Malvern), DLS (Z-sizer, Malvern) и ТЭМ. Модель ОРДС была вызвана введением ЛПС как описано [8].

Результаты. Экзосомы получали из костномозговых МСК крыс. Для того, чтобы избежать попадания в препарат экзосом из фетальной бычьей сыворотки, клетки несколько раз промывали бессывороточной средой и культивировали на ней в течении 48 часов. Технология выделения экзосом при помощи тангенциальной фильтрации и гель-фильтрации позволило получить достаточно однородный препарат экзосом. Средний размер частиц в препарате составлял от 50 до 100 нм. Количество частиц, полученных из 1 литра культуральной жидкости составило около $3*10^{10}$.

В нашей работе была использована модель ОРДС у крыс, полученная введением ЛПС E. coli. При дозах, часто используемых в подобных экспериментах, количество павших животных не превышало 50%, мы же хотели получить процент павших животных около 80%. Подбор доз показал, что такой процент павших животных получается только при дозе 25 мг/кг. При такой дозе в ткани легких у крыс морфологические изменения возникают через 6 часов после введения ЛПС.

При изучении патоморфологических изменений было установлено, что в лёгочной ткани встречаются очаги дистелектаза (рис. 1 А), преимущественно, в центральных областях, тогда как по периферии - участки эмфиземы (рис. 1 Б). Ярко выражены периваскулярные отёки и повышена воспалительная инфильтрация (рис. 1В-Е). Выявляется инфильтрация большинства альвеол нейтрофилами, альвеолярные отеки с увеличенным содержанием макрофагов и слущенным эпителием (рис. 1Г). Отмечается гиперплазия лимфоидных фолликулов.

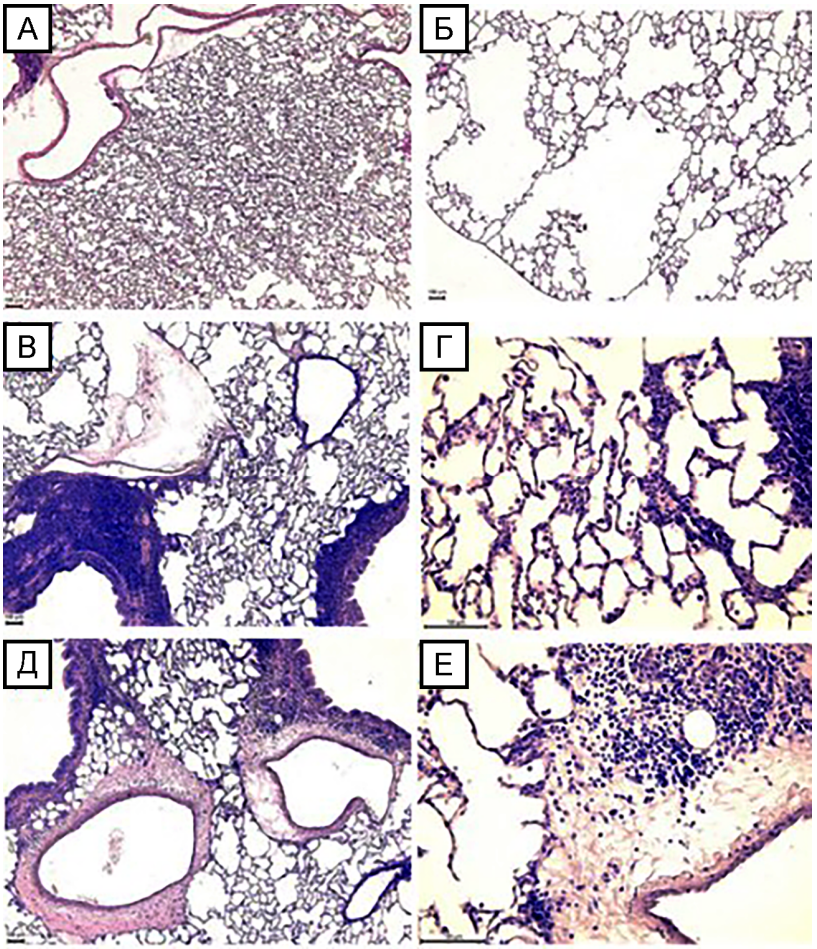


Рис. 1. Морфологическая структура легких животных через 6 час после введения ЛПС. А. Очаг дистелектаза в ткани лёгких. Светлопольная микроскопия, увеличение 50х. Б. Очаг ателектаза в ткани лёгких. Светлопольная микроскопия, увеличение 50х. В. Дистелектаз, гиперплазия лимфоидных фолликулов, периваскулярный отёк. Светлопольная микроскопия, увеличение 50х. Г. Альвеолярный отёк, инфильтрация альвеол нейтрофилами и макрофагами. Светлопольная микроскопия, увеличение 200х. Д. Периваскулярный отёк, гиперплазия лимфоидных фолликулов. Светлопольная микроскопия, увеличение 50х. Е. Участок периваскулярного отёка и периваскулярной воспалительной инфильтрации. Светлопольная микроскопия, увеличение 200х.

Но на этот срок критических изменений в легких не наблюдалось. Смерть 60% животных на первые сутки, ещё 20% до 40 часов и остальные к 9 дню.

Падеж животных, вероятно, явился следствием общего мощного токсического воздействия ЛПС, выделением провоспалительных цитокинов (цитокиновый шторм).

Экзосомы, полученные из МСК продемонстрировали хорошие терапевтические свойства на доклинических моделях ОРДС. Они снижали уровень воспалительных факторов и окислительный стресс при ОПЛ [12].

У крыс, получивших ЛПС в количестве 25 мг/кг, уже через 1,5 часа проявлялись признаки нездоровья: вялость, потеря аппетита, сгорбленность, взъерошенная шерсть, позже: серозно-слизистые выделения из носа, гнойные выделения из глаз, часто понос. Эти признаки подтверждают возникновение системного воспалительного процесса. К суткам потеря веса составляла 2%, ко вторым - 8,3%, крысы, выживавшие до 9 дня, теряли до 23% веса. В первые сутки пало 60% крыс, к 40 часам – 80% (группа отрицательный контроль (ЛПС)). В опытной группе крысам через 20 часов после ЛПС вводили экзосомы, полученные из бессывороточного секретома культивированных МСК КМ крыс, в хвостовую вену по $2x10^9$ в 0,8 мл физ.раствора (группа опыт (ЛПС+экзосомы). В качестве положительного контроля были использованы интактные животные. После лечения крысы оставались живыми, некоторое время теряли вес, затем он стабилизировался и через несколько дней начинал прибавляться. Наблюдение за всеми выжившими крысами велось до восстановления у них первоначального веса. Из 10 крыс, получивших ЛПС, 8 пали. Из 10 крыс, пролеченных экзосомами, 8 остались в живых. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

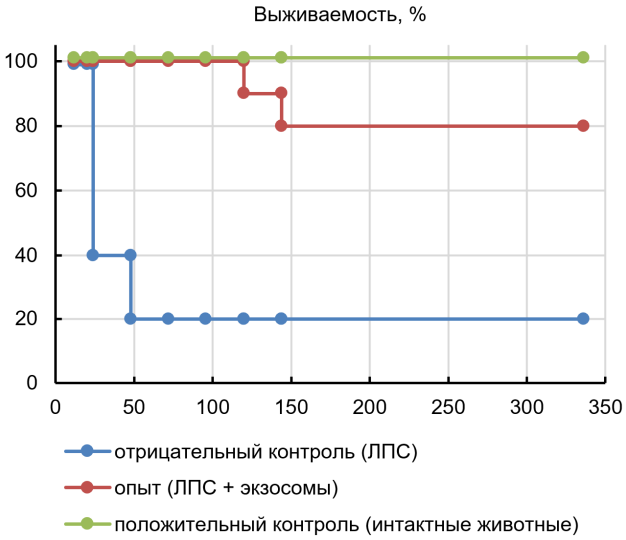


Рис. 2. Выживаемость животных после введения ЛПС и терапии экзосомами спустя 24 часа.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что экзосомы, продуцируемые костномозговыми МСК, обладают значительным противовоспалительным потенциалом и способны оказывать терапевтический эффект при ОРДС на модели лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest. 2012 Aug;122(8):2731-40. doi: 10.1172/JCI60331
2. Silversides JA, Ferguson ND. Clinical review: Acute respiratorydistress syndrome - clinical ventilator management and adjunct therapy. Crit Care. 2013 Apr 29;17(2):225. doi:10.1186/cc11867.
3. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, Rojas M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Jul;.293(1):L131–41. doi:10.1152/ajplung.00431.2006.
4. Chen TG, Zhong ZY, Sun GF, Zhou YX, Zhao Y. Effects of tumour necrosis factor-alpha on activity and nitric oxide synthase of endothelial progenitor cells from peripheral blood. Cell Prolif. 2011 Aug;44(4):352-9. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00764.x.

5. Wei H, Li Z, Hu S, Chen X, Cong XJ. Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. Cell Biochem. 2010 Nov 1;111(4):967-78. doi:10.1002/jcb.22785.
6. Li P, Zhou C, Yin L, Meng X, Zhang L. Role of hypoxia in viability and endothelial differentiation potential of UC-MSCs and VEGF interference. Zhong Nan Da XueXueBao Yi Xue Ban. 2013 Apr;38(4):329-40. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.04.001.
7. Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. Life Sci. 2011 Jan 3;88(1-2):65-73. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.023.
8. Chailakhyan R.K., Aver'yanov A.V., Zabozlaev F.G. et al. Comparison of the Efficiency of Transplantation of Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Cultured under Normoxic and Hypoxic Conditions and Their Conditioned Media on the Model of Acute Lung Injury. Bull Exp Biol Med 157, 138–142 (2014). https://doi.org/10.1007/s10517-014-2509-x
9. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. Stem Cells.2011 Jun;29(6):913-9. doi: 10.1002/stem.643.
10. Deng H, Wu L, Liu M, Zhu L , Chen Y, Zhou H et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Attenuate LPS-Induced ARDS by Modulating Macrophage Polarization Through Inhibiting Glycolysis in Macrophages. Shock. 2020; 54(6): 828-43.doi.org/10.1097/SHK.0000000000001549
11. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, Kissenpfennig A, McAuley DF, O'Kane CM et al. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Macrophages in Clinically Relevant Lung Injury Models by Extracellular Vesicle Mitochondrial Transfer. Am J Respir Crit Care Med. 2017;196 (10):1275-286. doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC.
12. Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. Front Immunol. 2022; 13:971189. doi.org/10.3389/fimmu.2022.971189

ИНДУКЦИЯ ФИНАЛЬНОГОСОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСРЕДСТВОМ СУБЗОНАЛЬНОЙ МИКРОИНЪЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ

Зингеренко Б.В.[1], Макарова Н.П.[1], Сысоева А.П.[1], Евтушенко Е.А.[2], Кулакова Е.В.[1], Калинина Е.А.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Россия, Москва, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Введение. Несмотря на технологический прогресс в области вспомогательных репродуктивных технологий, эффективность созревания ооцитов *in vitro* (IVM) остаётся субоптимальной [1]. Исследования Gabryś с соавт. (2024) демонстрируют, что оптимизированные протоколы IVM критически важны для пациенток с синдромом поликистозных яичников и онкологическими заболеваниями, проходящими процедуры сохранения фертильности [2]. В настоящее время предложены разные схемы оптимизаций протоколов IVM. Например, показано, что аутологичное соокультивирование с кумулюсными клетками значительно улучшает параметры созревания ооцитов в стимулированных циклах ЭКО-ИКСИ [3]. Современные исследования показывают, что модификация культуральных сред компонентами фолликулярной микросреды, в частности, внеклеточными везикулами (ВВ), значительно повышает качество ооцитов и эмбрионов [3]. Согласно научным публикациям, ВВ фолликулярной жидкости улучшают ядерное созревание незрелых ооцитов на 20%, что коррелирует с реорганизацией органелл и модификацией белкового профиля клетки [4]. Молекулярные механизмы, опосредующие действие ВВ ФЖ включают транспорт регуляторных микроРНК и белков, модулирующих экспрессию генов в ооцитах. Протеомный анализ ВВ ФЖ выявил наличие факторов, критичных для активации сигнальных каскадов PI3K/Akt и MAPK, регулирующих мейотическое возобновление и цитоплазматическое созревание [5].

Интеграция данных подходов с применением ВВ ФЖ демонстрирует синергетический эффект, что подтверждается исследованиями, показавшими повышение частоты наступления беременности на 15% при использовании ооцитов, подвергшихся оптимизированным протоколам IVM. Протоколы CAPA (Capacitation-

IVM) и CAPA-IVM с дополнительной суплементацией ВВ ФЖ представляют собой многообещающие направления для пациенток с низким овариальным резервом и субоптимальным ответом на гормональную стимуляцию [6]. Комплексный транскриптомный анализ ооцитов после воздействия ВВ ФЖ свидетельствует об активации генов, ассоциированных с редокс-гомеостазом и митохондриальной функцией, что коррелирует с улучшенной компетенцией к последующему развитию. Более того, показано, что ВВ ФЖ с возрастом женщины меняют свой состав, что отражается на компетентности женской половой клетки [7].

Таким образом, разработка инновационных протоколов IVM представляет собой приоритетное направление современной репродуктивной медицины.

Цель. Оптимизация протокола дозревания ооцитов на стадии GV с помощью инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку женской гаметы.

Материалы и методы. Исследуемый материал был представлен незрелыми ооцитами на стадии герминального везикула (GV), полученными от пациенток программ ВРТ, подписавших информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критерием включения пациенток в протокол служило наличие не менее двух незрелых GV-ооцитов при трансвагинальной пункции. Всего в экспериментальную группу (EV-IVM) было включено 53 незрелых ооцита, а в контрольную – 18. Микроинъекцию внеклеточных везикул фолликулярной жидкости (ВВ ФЖ) осуществляли субзонально через 4 часа после денудации ооцитов с использованием микроманипуляционной техники ИКСИ. Объем инъецируемой суспензии ВВ ФЖ составлял приблизительно 600 пл, что рассчитывалось исходя из параметров ооцита (диаметр 130 мкм) и внутреннего диаметра микроиглы (4,6 мкм, ORIGIO, Дания). Контрольная группа культивировалась в идентичных условиях (Sage ONE step, ORIGIO, Дания) без микроманипуляционных вмешательств. Через 17 часов культивирования проводили морфологическую оценку стадии ядерного созревания ооцитов. Фолликулярную жидкость для последующего выделения ВВ и инъекции получали у здоровых доноров ооцитов из программы ВРТ (ФГБУ НМИЦ АГП им. Кулакова) после информированного согласия и одобрения этического комитета. Овариальную стимуляцию вели по рекомендациям «Женское бесплодие» (2024) с гонадотропинами и антагонистами ГнРГ; в качестве триггера финального созревания применяли ХГЧ. От каждого донора из доминантного фолликула без примеси крови собирали 5 мл ФЖ. Внеклеточные везикулы выделяли последовательным центрифугированием (400 g × 10 мин; 10 000 g × 30 мин при 4°C; 108 000 g согласно протоколу ISEV), ресуспендировали в 100 мкл PBS, делили на аликвоты и хранили при –80°C до инъекции.

Для контроля выделения ВВ проводили трансмиссионную электронную микроскопию, которую выполняли рутинным методом, описанным ранее [5]. Конечной точкой исследования служила: частота созревания до MII и эффективность оплодотворения (отношение числа зигот к количеству MII-ооцитов).

Результаты. Согласно проведенной трансмиссионной электронной микроскопии, ВВ были успешно выделены их ФЖ донора, показаны на рисунке 1 стрелками.

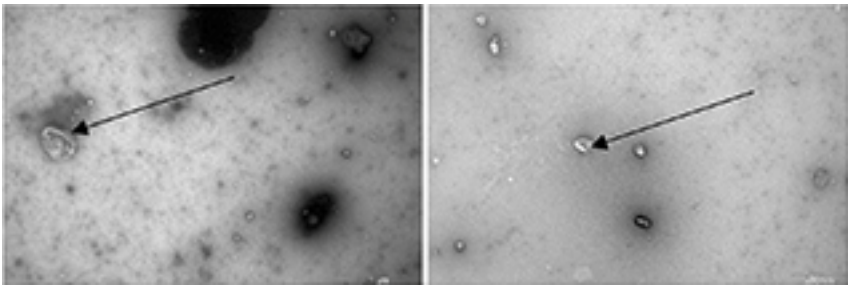


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости донора. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях. Стрелками указаны ВВ.

Эффективность инъекции оценивали по частоте достижения ооцитами стадии MII. В экспериментальной группе, которой проводили субзональную инъекцию фолликулярных внеклеточных везикул, показатель созревания составил 73,5%, тогда как в контроле – 33,3% (p=0,003), что свидетельствует о высокой клинической значимости метода.

Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости являются ключевыми медиаторами межклеточной коммуникации, транспортирующими биологически активные молекулы, способные модифицировать функции ооцитов. Экспериментальные исследования на животных моделях продемонстрировали, что дополнение культуральной среды везикулами, выделенными из малых фолликулов, повышает выход бластоцист, индуцирует альтерации в транскриптоме эмбрионов и модифицирует профили метилирования ДНК. В нашей работе использован уникальный метод инъецкии ВВ ФЖ, который показал свою эффективность. Стоит отметить, что подобные эксперименты на ооцитах человека ранее не были опубликованы в научной литературе.

Настоящее исследование является пилотным, выборка малочисленна и должна быть расширена для воспроизводимости результата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang H, Cai H, Zhang M, Guo C, Wang P, Deng N, Bao H, Meng F, Li Q, Ma S, Kong S, Deng W, Zhang H, Xia G, Wang F, Wang C, Wang H. Pathogenic mechanism of abnormal expression of HDAC3 in ovulatory granulosa cells inducing oocyte maturation disorder and its application in IVM. J Biol Chem. 2025 Mar;301(3):108287. doi: 10.1016/j.jbc.2025.108287. Epub 2025 Feb 10. PMID: 39938798; PMCID: PMC11923827.
2. Gabryś J, Gurgul A, Szmatoła T, Kij-Mitka B, Andronowska A, Karnas E, Kucharski M, Wojciechowska-Puchałka J, Kochan J, Bugno-Poniewierska M. Follicular Fluid-Derived Extracellular Vesicles Influence on In Vitro Maturation of Equine Oocyte: Impact on Cumulus Cell Viability, Expansion and Transcriptome. Int J Mol Sci. 2024 Mar 13;25(6):3262. doi: 10.3390/ijms25063262. Erratum in: Int J Mol Sci. 2024 Jun 21;25(13):6812. doi: 10.3390/ijms25136812. PMID: 38542236; PMCID: PMC10970002
3. Lipinska P, Smits K, Van Soom A, Pavani KC, Warzych E. Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality†. Biol Reprod. 2025 Apr 24:096. doi: 10.1093/biolre/ioaf096. Epub ahead of print. PMID: 40272384.
4. Pan B, Li X, Yang Q, Xie Y, Chen Z, Yu J, He H, Xiong Y, Fu W, Yin S, Lan D, Li J, Xiong X. Exosomes derived from follicular fluid promote proliferation and suppress apoptosis of yak (Bos grunniens) granulosa cells by enhancing antioxidant capacity in vitro. Anim Reprod Sci. 2025 Mar;274:107790. doi: 10.1016/j.anireprosci.2025.107790. Epub 2025 Jan 31. PMID: 39903977.
5. Dlamini NH, Bridi A, da Silveira JC, Feugang JM. Unlocking Gamete Quality Through Extracellular Vesicles: Emerging Perspectives. Biology (Basel). 2025 Feb 13;14(2):198. doi: 10.3390/biology14020198. PMID: 40001966; PMCID: PMC11851576.
6. Pérez-García F, Muñoz-Acuña E, Valencia C, Aguila L, Felmer R, Arias ME. Effect of Bovine Follicular Fluid Small Extracellular Vesicles Isolated by Ultracentrifugation and Chromatography on In Vitro Oocyte Maturation and Embryo Development. Int J Mol Sci. 2025 Mar 22;26(7):2880. doi: 10.3390/ijms26072880. PMID: 40243476; PMCID: PMC11988610.
7. Sysoeva AP, Makarova NP, Silachev DN, Lobanova NN, Shevtsova YA, Bragina EE, Kalinina EA, Sukhikh GT. Influence of Extracellular Vesicles of the Follicular Fluid on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm. Bull Exp Biol Med. 2021 Dec;172(2):254-262. doi: 10.1007/s10517-021-05372-4. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34855079.

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ СЕКРЕТОМА, АССОЦИИРОВАННОГО СО СТАРЕНИЕМ В ФОРМИРОВАНИИ И ПОДДЕРЖАНИИ СЕНЕСЦЕНТНОГО ФЕНОТИПА МСК

Каменков С.С.[1], Чечехин В.И.[1], Зиновьева А.А.[1], Бахчинян Е.[1], Ефименко А.Ю.[2], Кулебякин К.Ю.[1], Тюрин-Кузьмин П.А.[1], Чечехина Е.С.[1]

[1]Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-исследовательского института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Центр регенеративной медицины Медицинского научно-исследовательского института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Жировая ткань является разновидностью соединительной ткани, образующейся из мезенхимы, представлена в различных частях организма и состоит преимущественно из адипоцитов и клеток стромально-васкулярной фракции. Помимо участия в запасании липидов, жировая ткань способна продуцировать ряд гормонов, что делает ее важной частью эндокринной системы человека. Важным фактором метаболического здоровья человека является постоянное обновление и нормальная регуляция жировой ткани.

Обновление тканей — ключевой процесс, обеспечивающий поддержание гомеостаза и восстановление в ответ на повреждения, старение и другие факторы. Эффективность обновления ткани зависит от скоординированной работы механизмов пролиферации, направленной дифференцировки, миграции и программируемой гибели клеток [1]. Регуляция обновления ткани осуществляется за счет работы так называемой ниши стволовых клеток, представляющей собой стволовые клетки и их микроокружение, формируемое гормональными и паракринными сигналами, а также межклеточными контактами [2].

В обновлении жировой ткани особую роль играют мезенхимные стромальные клетки (МСК). МСК представляют собой постнатальные стволовые клетки взрослого организма, обладающие способностью к пролиферации и дифференцировке в клетки мезодермальной линии: адипоциты, хондроциты и остеобласты. Помимо этого, МСК являются активными участниками паракринной регуляции, выделяя широкий спектр биологически активных молекул: цитокинов, факторов роста, а также микроРНК в составе внеклеточных везикул (ВВ). Секретом МСК участвует в модуляции воспалительных процессов, стимулирует ангиогенез и привлекает иммунные и прогениторные клетки к поврежденным участкам ткани [3]. Помимо прямого участия в

восстановлении повреждения за счет пролиферации и дифференцировки, МСК опосредуют регенерацию, взаимодействия с иммунными клетками в своем микроокружении.

В жировой ткани МСК участвуют в поддержании и увеличении популяции адипоцитов, а также регулируют липидный обмен. Сама жировая ткань подвержена сложной нейрогуморальной регуляции. Одним из основных регуляторов жировой ткани является инсулин. С возрастом наблюдается снижение чувствительности МСК к данному гормону, приводящее к развитию метаболического синдрома и ожирения [4].

Старение МСК ассоциировано со снижением их пролиферативного и дифференцировочного потенциала. Кроме того, при старении формируется секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP), компоненты которого способны изменять свойства как самих МСК, так и окружающих их клеток. По своему составу растворимая фракция SASP характеризуется наличием широкого спектра провоспалительных молекул, а нерастворимая везикулярная – значительным изменением профиля микроРНК в составе ВВ [5]. Развивающаяся под воздействием SASP инсулинорезистентность снижает эффективность адипогенной дифференцировки МСК и нарушает обмен липидов. Данные изменения снижают регенеративный потенциал МСК, затрудняя обновление ткани и приводя к развитию возраст-ассоциированных заболеваний.

Ранее нами было показано снижение чувствительности МСК к инсулину при воздействии компонентов ВВ сенесцентных клеток. Формирование инсулинорезистентности происходило за счёт повышения базального уровня активации PI3K/Akt инсулинового сигнального каскада [6]. В данном исследовании мы показываем молекулярные механизмы воздействия секретома сенесцентных клеток и раскрываем его влияние на функции окружающих клеток.

Материалы и методы. В исследовании использовались клетки, полученные от доноров моложе 45 (n=10) и старше 65 лет (n=8), клетки которых были обозначены как «Молодые» и «Сенесцентные» соответственно. Оценка клеточного старения проводилась путем изучения пролиферативной активности, времени удвоения популяции, уровня экспрессии p21 и активности β-галактозидазы. ВВ были получены от сенесцентных и молодых МСК путем кондиционирования клеток в бессывороточной среде в течении 48 часов с последующей фильтрацией для удаления фрагментов клеток и регуляторных молекул. Влияние компонентов ВВ на МСК оценивали после 24 часовой обработки ВВ (инкубации клеток с добавлением суспензии ВВ) с предварительной депривацией в бессывороточной среде. Анализ мРНК проводили с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве генов домашнего

хозяйства для оценки уровня экспрессии были использованы ACTB и RPLP0. Уровень белка оценивали с помощью вестерн-блоттинга с нормировкой на винкулин/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Оценку уровня белка в различных компартментах проводили с помощью вестерн блоттинга с предварительным разделением фракций методом высаливания. Нормировку проводили на гистон H3 для ядерной фракции и на бета-актин для цитоплазматической фракции. Для определения локализации белка по компартментам клетки использовали иммуноцитохимическое окрашивание после фиксации клеток формальдегидом и пермеабилизации 0,2% раствором Triton X-100.

Результаты. В предыдущей работе нами было показано снижение эффективности адипогенной дифференцировки МСК молодых доноров под действием внеклеточных везикул сенесцентных клеток. Кроме того, было продемонстрировано, что снижение эффективности адипогенной дифференцировки МСК пожилых доноров опосредовано повышением базального уровня фосфорилирования pAkt – участника PI3K/Akt инсулинового сигнального каскада. В рамках продолжения данной работы нами было показано аналогичное повышение уровня pAkt в МСК молодых доноров после воздействия ВВ сенесцентных клеток. Чтобы объяснить механизмы ауто- и паракринного влияния молекул в составе ВВ на эффективность адипогенной дифференцировки, нами был проведён сравнительный анализ профиля микроРНК во ВВ, полученных от МСК молодых и пожилых доноров. В результате нами был получен перечень микроРНК, уникальных или повышенных в составе ВВ МСК пожилых доноров. С помощью биоинформатического анализа были определены мишени данных микроРНК, среди которых были обнаружены участники и регуляторы инсулинового сигнального каскада – PTEN, IGF1R, MDM2 и AGO1.

Для того, чтобы проверить влияние компонентов ВВ на выявленные мишени, мы проанализировали экспрессию белков PTEN, IGF1R, MDM2 и AGO1 методом вестерн-блоттинга. Нами было показано, что уровень IGF1R и MDM2 не изменяется в ответ на воздействие ВВ, а AGO1 подвергается даунрегуляции. В отношении белка PTEN было обнаружено, что воздействие ВВ МСК пожилых доноров приводит к значительному увеличению его экспрессии. Данное наблюдение противоречит известным микроРНК-опосредованным механизмам регуляции PTEN. Для оценки аутокринного эффекта микроРНК к PTEN в составе ВВ мы сравнили его уровень в молодых и сенесцентных клетках и показали значительную апрегуляцию PTEN в клетках пожилых доноров.

Повышение уровня PTEN в результате воздействия ВВ, несмотря на увеличение уровня микроРНК в составе ВВ, а также несмотря на увеличение базального уровня активации Akt свидетельствуют о том, что

существует механизм, регулирующий экспрессию и активность PTEN. Мы предположили, что данный феномен может быть объяснен нетипичной компартментализацией PTEN в клетке. Методом иммуноцитохимического окрашивания нами было показано, что в сенесцентных клетках PTEN преимущественно локализован в ядре, а в молодых клетках в цитоплазме. Данные об изменении локализации PTEN были также подтверждены методом иммуноблоттинга после разделения цитоплазматической и ядерной фракций методом высаливания. Нами было продемонстрировано повышение уровня PTEN в ядерной фракции при неизменном уровне PTEN в цитоплазматической фракции. Таким образом, мы показали, что при старении происходит повышение уровня PTEN в МСК за счёт накопления данного белка в ядрах клеток.

Накопление ядерного PTEN в МСК в ответ на воздействие ВВ с регуляторными микроРНК может также быть связано с наличием внутриклеточных механизмов, защищающих от РНК-интерференции. Так, ранее было показано существование некодирующих РНК, участвующих в регуляции экспрессии генов за счёт связывания микроРНК. Для мРНК *PTEN* было показано существование псевдогена *PTENP1*, имеющего аналогичную гомологию к большому числу микроРНК [7]. Поэтому мы предположили участие *PTENP1* в поддержании высокого уровня белка PTEN в сенесцентных клетках. С помощью ПЦР в реальном времени, нами было показано многократное повышение уровня мРНК *PTENP1* в сенесцентных клетках по сравнению с молодыми. Уровень мРНК *PTEN* при этом оставался неизменным. Наблюдаемые изменения подтверждают предполагаемый нами механизм участия *PTENP1* в регуляции экспрессии *PTEN* в клетках при старении. За счет связывания микроРНК *PTENP1* может поддерживать высокий уровень белка PTEN в клетке и способствовать его накоплению в ядре.

Заключение. Полученные нами результаты свидетельствуют об участии PTEN в формировании сенесцентного фенотипа МСК, раскрывая взаимодействие между процессами клеточного старения, сигнальными путями и регуляцией ткани.

В молодых МСК PTEN преимущественно локализован в цитоплазме, где выполняет роль фосфатазы PI3P, ингибируя PI3K/Akt инсулиновый сигнальный каскад. Ранее нами было показано снижение чувствительности клеток МСК к инсулину за счет повышенного уровня активации PI3K/AKT сигнальных каскадов [6]. Повышение уровня PTEN в сенесцентных МСК должно было противоречить этим данным, однако нами было показано повышение уровня PTEN в стареющих клетках исключительно за счёт ядерной фракции белка. Ядерная локализация PTEN связана с его принципиально иной биологической ролью: в ядре PTEN участвует в поддержании стабильности генома и остановке клеточного цикла [8].

Данное исследование также раскрывает роль паракринного влияния стареющих МСК через внеклеточные везикулы. Внеклеточные везикулы сенесцентных клеток обогащены микроРНК, способными регулировать экспрессию участников инсулинового сигнального каскада, тем самым модулируя инсулиновую чувствительность соседних клеток и способствуя накоплению нарушений в ткани.

Особый интерес представляет показанное нами повышение экспрессии *PTENP1* в сенесцентных МСК и возможная регуляция экспрессии *PTEN* через данный псевдоген. Блокируя связывание мРНК *PTEN* с микроРНК, тем самым препятствуя РНК-интерференции, *PTENP1* может способствовать поддержанию высокого уровня белка PTEN в ядре, несмотря на изменения, вызываемые клеточным старением и изменёнными паракринными сигналам [7].

Наблюдаемый подъём уровня белка PTEN в сенесцентных МСК за счёт изменения локализации, подчеркивает его особую роль в процессах клеточного старения и регуляции обновления ткани. В МСК молодых доноров PTEN преимущественно стимулирует клеточное выживание и пролиферацию за счёт регуляции PI3K/Akt сигнальных путей. При старении происходит повышение уровня ядерного PTEN, направленное на поддержание генетической стабильности и остановку клеточного цикла [9].

Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на роль PTEN в возраст-ассоциированных изменениях. Наши данные демонстрируют его адаптивную функцию в условиях клеточного старения. Переключение PTEN с цитоплазматических на ядерные функции представляет собой важный механизм поддержания тканевого гомеостаза при старении.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-75-30007 Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека (https://rscf.ru/project/19-75-30007/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sagaradze GD, Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. Front Cell Dev Biol. 2020;8.
2. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther. 2007;9:204.
3. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8:726-36.
4. Kalinina NI et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. Acta Naturae. 2011;3:30–7.

5. Siraj Y, Galderisi U, Alessio N. Senescence induces fundamental changes in the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for the therapeutic use of MSCs and their derivates. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11.
6. Voynova E, Kulebyakin K, Grigorieva O, Novoseletskaya E, Basalova N, Alexandrushkina N, et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo. Front Cell Dev Biol. 2022;10.
7. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. Nature. 2010;465:1033–8.
8. Ho J, Cruise ES, Dowling RJO, Stambolic V. PTEN Nuclear Functions. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10:a036079.
9. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene. 2008; 27:5443-53.

МОДИФИКАЦИЯ МЕМБРАНЫ ИЗ АЦЕТАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ ЖИДКОЙ БИОПСИИ

Моисеева Е.О.[1], Кожевникова Д.Д.[1], Ященок А.М.[1], Сергеев И.С.[1], Алентов И.И.[2], Горин Д.А.[1], Чернышев В.С.[1,3]

[1]Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия
[2]Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России, Москва Россия
[3]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

Анализ внеклеточных везикул (ВВ), полученных из опухоли, является перспективным инструментом диагностики и мониторинга лечения рака на ранней стадии. Однако, многие современные методы, используемые для выделения и обнаружения ВВ, являются трудоемкими и часто требующими дорогостоящего оборудования, которое в свою очередь требует досконального обучения. Кроме того, большинство этих методов не могут избирательно изолировать ВВ, обогащенных опухолеассоциированным белком, среди других неспецифических ВВ, присутствующих в образце [1]. Мембранные микрофлюидные флуоресцентные анализы являются простыми, недорогими и чувствительными методами обнаружения биомолекул, которые можно дополнительно улучшить посредством ковалентной биоконъюгации элементов молекулярного распознавания на целлюлозной матрице [2]. В этой работе мы представляем новое микрофлюидное устройство, со встроенной мембраной для жидкой биопсии на основе ВВ. Ацетат целлюлозы биоконъюгируется с помощью двухэтапного протокола с использованием связи 3-аминопропилтриэтоксисилан-глутаральдегид для ковалентного связывания аминомодифицированного аптамера против CD63 [3]. Показано, что функционализированная целлюлозная поверхность селективно связывает везикулы из клеточной культуральной среды и человеческой плазмы. Условия реакции и процедуры промывки оптимизированы для предотвращения неспецифического связывания белков, везикул и олигонуклеотидов с матрицей мембраны. Успешное селективное обнаружение CD63+/EpCAM+ и CD63+/HER2+ ВВ

продемонстрировано в мембранном сэндвич-иммуноанализе. Этот мембранный селективный захват и маркировка BB демонстрирует применимость этой сенсорной платформы для обнаружения опухолеположительных везикул, которую можно адаптировать для тестирования в любом месте нахождения пациента и мониторинга после лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Mongui´o-Tortajada, C. G´alvez-Mont´on, A. Bayes-Genis, S. Roura, F.E. Borr`as, Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. CMLS. 2019; 76: 2369–2382.
2. V.S. Chernyshev, A. Yashchenok, M. Ivanov, D.N. Silachev, Filtration-based technologies for isolation, purification and analysis of extracellular vesicles. PCCP. 2023; 25: 23344–23357.
3. E.O. Moiseeva, D.D. Kozhevnikova, A.M. Yashchenok, I.S. Sergeev, I.I. Alentov, D.A. Gorin, V.S. Chernyshev. Surface modification of cellulose acetate membrane for fabrication of microfluidic platforms for express extracellular vesicle-based liquid biopsy. Microchemical Journal. 2025; 208: 112388.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МОЧИ В МОДЕЛИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧКИ

Певзнер И.Б.[1,2], Ломакина А.К.[3], Брезгунова А.А.[1], Горюнов К.В.[2], Силачёв Д.Н.[1,2], Плотников Е.Ю.[1,2]

[1]Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия
[3]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Внеклеточные везикулы (EV, extracellular vesicles) – наночастицы, секретируемые всеми типами клеток как в физиологических, так и в патологических условиях и найденные в различных биологических жидкостях организма. Одна из основных функций внеклеточных везикул – осуществление межклеточной коммуникации. Клетки могут секретировать различные типы EV, которые были классифицированы в соответствии с их субклеточным происхождением и размером: экзосомы (40-150 нм в диаметре), более крупные эктосомы (200-1000 нм) и апоптотические тельца (свыше 1000 нм) [1].

Клетки выделяют EV в межклеточное пространство и биологические жидкости, кровь, лимфу, мочу и т.д. В моче присутствуют EV, секретируемые всеми сегментами нефрона и клетками других частей урогенитального тракта: – всех отделов почки, мочеточника, мочевого пузыря, уретры [2]. Показано, что везикулы мочи (uEV, urinary extracellular vesicles) экспрессируют типичные экзосомальные маркеры, такие как тетраспанины (CD9, CD63 CD81), флотиллин-1, HSP70, Alix и TSG101 [1]. Более точно происхождение uEV можно определить по специфическим белковым маркерам. Так, для везикул, секретируемых дистальными канальцами почки, маркерами являются Prominin-2 и Thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, а для уротелия мочевого пузыря Uroplakin-1, Uroplakin-2 и Mucin-1 [2].

Везикулы мочи могут нести различные биологические функции, например, они являются иммунными эффекторами, поскольку обогащены антимикробными белками, а также белками, которые связываются с поверхностными молекулами бактерий [3]. В то же время, весь спектр функциональных свойств uEV остается неизвестным. Принимая во внимание то, что uEV опосредуют коммуникацию между клетками

нефрона и могут отражать повреждение почек [4], везикулы мочи могут стать перспективными неинвазивными биомаркерами заболеваний почек. Так, например, было обнаружено, что экзосомальный белок WT-1 является многообещающим биомаркером, который может отражать раннее повреждение подоцитов при фокальном сегментарном гломерулосклерозе или стероид-чувствительном нефротическом синдроме [5]. Уровни фетуина-A, аквапорина AQP1 и активирующего транскрипционного фактора ATF3 в uEV были идентифицированы как потенциальные биомаркеры острого повреждения почек [6].

В поисках биомаркеров почечного фиброза некоторые авторы исследуют содержание микроРНК (miR) в почечных везикулах. Обнаружено, что микроРНК семейств miR-29 и miR-200 были значительно снижены в uEV пациентов с хронической болезнью почек, и их количество коррелировало с функцией почек и степенью тубулярно-интерстициального фиброза [7]. Ряд микроРНК, например, miR-145, miR-192, miR-15b, miR-34a, miR-636, miR-320c мочевых везикул используются для ранней диагностики диабетической нефропатии [8]. Диагностической ценностью обладают также некоторые матричные РНК, обнаруживаемые в везикулах. В случае рака мочевого пузыря обнаружено, что уровень мРНК генов SLC2A1, GPRC5A и KRT17 был повышен в EV мочи. Авторы предполагают, что повышенные уровни этих мРНК могут быть многообещающими биомаркерами уротелиального рака [9].

Поскольку большинство исследований сосредоточено на изучении uEV как биомаркеров заболеваний, мы проанализировали наличие в них специфических белковых маркеров острого повреждения почек (ОПП), выделяемых с мочой, таких, как нейтрофильный желатиназа-ассоциированный липокалин (NGAL) [10]. Для моделирования ОПП крысам проводили ишемию/реперфузию (И/Р) почки, и затем с помощью обменных клеток собирали суточную мочу в период 3-24 ч. Тяжесть ОПП и дисфункции почки после И/Р контролировали по уровню конвенциональных маркеров ОПП, мочевины и креатинина, в сыворотке крови через 48 ч после операции.

Целью данной работы было изучение внеклеточных везикул, секретируемых с мочой, у интактных крыс и крыс после ишемии почки. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) Отработать методику получения интактных внеклеточных везикул из мочи крыс; 2) Охарактеризовать везикулы, полученные из мочи интактных крыс и крыс после ишемии почки, по количеству, размеру и экспрессии специфических маркеров; 3) Оценить возможность использования uEV в качестве биомаркеров ОПП; 4) изучить взаимодействие везикул мочи с клетками почки in vitro и их проникновение в клетку.

Дифференциальное центрифугирование и ультрацентрифугирование является общепринятым и относительно недорогим методом выделения экзосом с высоким выходом, применимым к большим объемам образцов в экспериментах с культуральной средой или с легкодоступными биологическими жидкостями, в частности, мочой [11]. Однако, ультрацентрифугирование может привести к частичной агрегации и деградации EV, а также проблемой может оказаться совместное с EV осаждение биомолекул, таких как липопротеины и белковые агрегаты с плотностью, аналогичной плотности EV [12]. Определяющими факторами конечной эффективности выделения EV являются вязкость образца, ускорение, тип ротора и собственные характеристики центрифуги.

Мы показали, что из мочи крыс методом ультрацентрифугирования выделяется гораздо большее количество uEV по сравнению с EV из культуральной среды от клеток эпителия почечных канальцев (ЭПК) (табл. 1). Количество везикул в препарате определялось методом анализа траекторий наночастиц с помощью прибора NanoSight LM10 (Malvern Panalytical, Великобритания), оснащенного синим лазером (405 нм, 60 мВт) и CMOS-камерой, а концентрация общего белка измерялась по поглощению при длине волны 280 нм на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты везикул uEV демонстрируют более высокие концентрации как общего белка, так и самих везикул. В везикулах мочи методом вестерн-блоттинга был определен характерный маркер экзосом TSG101 (данные не приведены). Таким образом, моча может являться более перспективным источником везикул для применения в диагностических и терапевтических целях.

Также отличается и распределение везикул по размерам. Средний диаметр везикул, продуцируемых клетками ЭПК *in vitro*, больше среднего диаметра везикул, продуцируемых клетками почки *in vivo*. Эти данные говорят о том, что везикулы, продуцируемые клетками почки *in vitro* и *in vivo*, обладают разными физическими характеристиками. Стоит отметить, что во время моделирования ишемии in vitro с помощью кислородно-глюкозной депривации (КГД) в ЭПК увеличилась доля везикул, превышающих в диаметре 200 нм, что соответствует размерам эктосом и апоптотических телец и может отражать повреждение клеток. Однако, в период восстановления клеток после КГД в полноценной питательной среде доля крупных везикул снижается до обычных значений. Однако, в моче не отмечается изменений в количестве крупных везикул в период 3-24 часа после И/Р, когда собирался биоматериал.

Табл. 1. Сравнительная характеристика везикул, полученных из культуральной среды первичной культуры эпителия почечных клеток (ЭПК) и из мочи крыс, как в физиологических условиях, так и после или во время моделирования повреждения. Числовые данные представлены в формате среднее ± ошибка среднего.

Источник везикул	Общая концентрация белка, мг/л	Общая концентрация частиц в культуральной среде/моче, 10^8 частиц/мл	Средний размер частиц, нм	Медиана размера частиц, нм	Доля частиц, с диаметром >200 нм, % от общего числа частиц
Культуральная среда ЭПК, физиологические условия	1,76± 0,88	7,96± 5,41	132,09± 9,08	115,39± 8,06	14,56± 3,57
Культуральная среда ЭПК, во время КГД	5,34± 1,92	1,63± 1,14	143,31± 11,90	129,20± 14,22	18,09± 4,30
Моча, интактные крысы	120,66± 43,59	287,11± 80,40	113,46± 5,17	98,93± 4,58	8,52± 1,75
Моча, крысы после ишемии-реперфузии	51,94± 28,65	126,14± 26,34	115,59± 6,25	102,27± 6,13	8,74± 1,53

Мы подтвердили, что при И/Р у крыс развивается ОПП, характеризующееся подъемом уровней мочевины и креатинина в сыворотке крови, в 7,3 и 3,8 раза, соответственно (Рис. 1). Мы обнаружили у крыс после И/Р появление в моче и супернатанте после центрифугирования при 108 000g специфического маркера ранней фазы ОПП NGAL (Рис. 2), однако его количество в препарате uEV очень незначительное, и скорее объясняется со-осаждением данного растворимого белка на мембранах везикул. Определение NGAL в моче уже введено в клиническую практику для ранней диагностики ОПП, но наши результаты показывают, что данный белок не секретируется направленно в uEV.

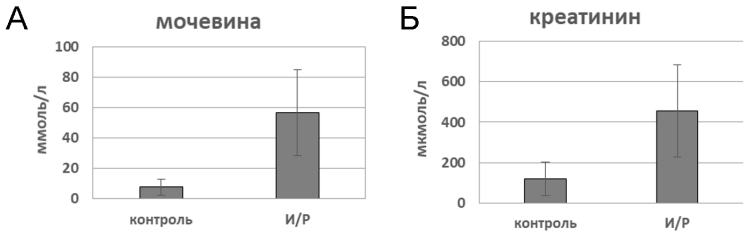


Рис. 1. Повышение уровней мочевины (А) и креатинина (Б) в сыворотке крови крыс после ишемии/реперфузии (И/Р) почки по сравнению с контрольными животными.

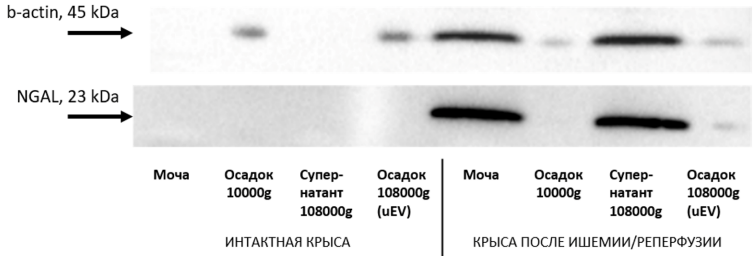


Рис. 2. Определение с помощью иммуноблоттинга биомаркера ОПП NGAL и структурного белка бета актина (b-actin) в моче и полученных из нее везикулах у интактных крыс и крыс после И/Р.

Бета-актин является также характерным белком в составе EV, причем он наблюдается как в эктосомах (крупных внеклеточных везикулах, осаждаемых при 10000 g), так и в экзосомах, осаждаемых при 108000 g. Его присутствие в везикулах, вероятно, объясняется процессом биогенеза EV из клеточной мембраны с захватом цитоплазматического содержимого. Интересным наблюдением стало обнаружение бета-актина в моче и супернатанте от выделения uEV у крыс после И/Р, при этом выброс большого количества актина в растворенном виде в мочу сокращает его количество в выделяемых везикулах обеих фракций. Факт обнаружения бета-актина в моче при ОПП определенно требует дальнейших исследований, так как ранее нами уже отмечалось падение уровня бета-актина в ткани почки после И/Р [13].

Биология, функции и гетерогенность внеклеточных везикул мочи зависят от донора, а именно от состояния клеток при продукции uEV.

Белковые компоненты, а также нуклеиновые кислоты и липиды в составе uEV могут выступать специфическими маркерами повреждения разных отделов почки. Так, у пациентов с реноваскулярной гипертензией была повышена доля фракции uEV, происходящих из подоцитов, по сравнению с везикулами от пациентов с эссенциальной гипертензией или здоровыми добровольцами [14]. Количество экзосом, юкстагломерулярных клеток и везикул, положительных по маркерам подоцитов, уменьшалось с возрастом [15], а например, моча женщин содержит больше везикул, чем моча мужчин.

Компоненты внеклеточных везикул могут играть важную роль в опосредованной EV межклеточной коммуникации и влиять на клетки-акцепторы как в непосредственной близости от клетки-донора, так и в отдаленных тканях организма, передаваясь через биологические жидкости. Для везикул часто демонстрируется высокая эффективность поглощения их клетками из культуральной среды и способность вызывать различные фенотипические ответы. EV, высвобождаемые клетками почечных канальцев, могут действовать на фибробласты, моноциты, макрофаги, Т-клетки и естественные киллеры, тем самым влияя на патогенез и прогрессирование почечных заболеваний, таких как острая почечная недостаточность, фиброз, нефролитиаз, отторжение почечного трансплантата и рак почки [16].

В исследовании роли uEV в остром почечном повреждении с помощью оптической визуализации отслеживали везикулы мочи, меченные флуоресцентным красителем и введенные внутривенно. Флуоресценция была обнаружена в селезенке и почках здоровых мышей и мышей с ОПП. При этом поврежденные почки демонстрировали более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению со здоровыми. Анализ ткани почек подтвердил преимущественное накопление uEV именно при повреждении органа. При этом везикулы ускоряли восстановление почек, уменьшая функциональные и гистологические нарушения, характерные проявления ОПП и стимулируя пролиферацию клеток канальцев. Более того, введение uEV резко подавляло активацию провоспалительных цитокинов при повреждении. В составе uEV был выявлен фактор Klotho - трансмембранный белок, имеющий решающее значение для регенерации почечной ткани, который обеспечивал восстановление уровня Klotho в поврежденной ткани после введения uEV [17].

Для исследования взаимодействия культивируемых клеток почки с внеклеточными везикулами мочи мы провели окрашивание везикул, выделенных из мочи крыс, мембранным красителем PKH26 и инкубировали их с клетками эпителия почки собаки MDCK, окрашенных красителем Calcein Green с последующей визуализацией при помощи

конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Через 3 часа после инкубации с uEV мы наблюдали PKH26-положительные частицы в отдельных клетках, тогда как через 24 часа инкубации число таких частиц в клетках значительно увеличивается. В контрольных клетках, не получавших везикул, не было отмечено флуоресценции в желто-красном спектре, который соответствует спектру эмиссии красителя PKH26.

При проведении сканирования по z-оси мы наблюдали, что везикулы располагаются в пределах цитоплазмы как через 3 часа, так и через 24 часа инкубации (Рис. 3). Таким образом, везикулы поглощаются клетками уже через 3 часа после добавления uEV в культуральную среду, а через 24 часа их число в цитоплазме значительно увеличивается. Это говорит о том, что содержимое экзосом эффективно воспринимается клетками-реципиентами *in vitro*.

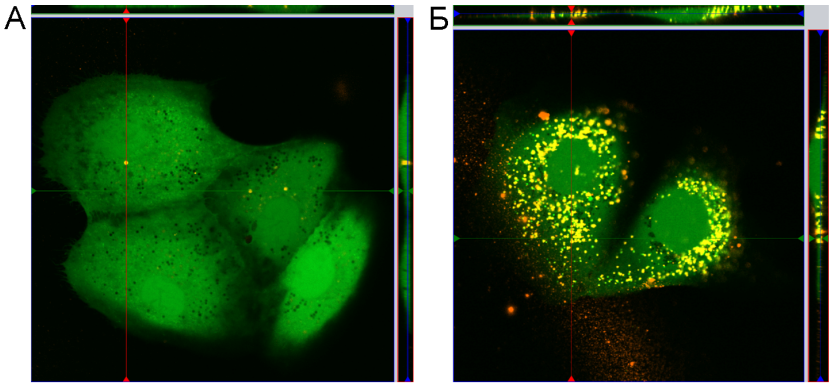


Рис. 3. Оптические срезы по z-оси клеток MDCK, инкубированных с внеклеточными везикулами в течение 3 часов (А) или 24 часов (Б). uEV окрашены красителем PKH26 (красная флуоресценция), клетки нагружены цитоплазматическим красителем Calcein (зеленая флуоресценция).

Чтобы уточнить внутриклеточное расположение поглощенных клетками везикул, мы также провели окрашивание лизосом клеток красителем LysoTracker Green после инкубации с везикулами, окрашенными красителем PKH26. Обнаружено, что везикулы, окрашенные PKH26 и поглощенные клеткой за 24 часа, частично ко-локализуются с клеточными структурами, окрашенными красителем LysoTracker, то есть с поздними эндосомами и лизосомами.

Таким образом, в данной работе мы показали, что из мочи выделяется значительное количество внеклеточных везикул, несущих характерные белковые маркеры, в частности TSG101 и бета-актин. В моче

крыс после ишемии/реперфузии почки появляется большое количество как маркера ранней фазы ОПП белка NGAL, так и бета-актина в растворенной форме, что отражает повреждение клеток во время И/Р. Мы выяснили, что NGAL не секретируется направленно в uEV. Учитывая простой и неинвазивный способ получения биоматериала, определение бета-актина в моче может быть рекомендовано как дополнительный тест на повреждение почки и рассматриваться как основа для создания новых диагностических наборов для быстрого выявления ОПП. Мы продемонстрировали эффективное проникновение uEV в клетки эпителия почки *in vitro*, при этом часть окрашенных везикул обнаруживается в поздних эндосомах и лизосомах.

Механизмы взаимодействия везикул мочи с различными клетками и их биологическую роль еще предстоит установить. Учитывая большое количество выделяемых из мочи внеклеточных везикул, они представляют интерес в качестве новых биомаркеров заболеваний, а также многообещающих терапевтических агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 25-25-00089.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ranghino A, Dimuccio V, Papadimitriou E, Bussolati B. Extracellular vesicles in the urine: markers and mediators of tissue damage and regeneration. Clin Kidney J. 2015;8(1):23-30.
2. Erdbrügger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp IV, et al. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles. J Extracell Vesicles. 2021; 10(7):e12093.
3. Hiemstra TF, Charles PD, Gracia T, et al. Human urinary exosomes as innate immune effectors. J Am Soc Nephrol. 2014;25(9):2017-2027.
4. Kamińska A, Platt M, Kasprzyk J, et al. Urinary Extracellular Vesicles: Potential Biomarkers of Renal Function in Diabetic Patients. J Diabetes Res. 2016; 2016:5741518.
5. Zhou H, Kajiyama H, Tsuji T, et al. Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;305(4):F553-F559.
6. Zhang W, Zhou X, Zhang H, et al. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. Am J Physiol Renal Physiol. 2016;311(5):F844-F851.
7. Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;305(8):F1220-F1227.
8. Jing H, Tang S, Lin S, et al. The role of extracellular vesicles in renal fibrosis. Cell Death Dis. 2019;10(5):367.
9. Murakami T, Yamamoto CM, Akino T, et al. Bladder cancer detection by urinary extracellular vesicle mRNA analysis. Oncotarget. 2018;9(67):32810-32821.

10. Yousef AM. The efficacy of novel biomarkers for the early detection and management of acute kidney injury: A systematic review. PLoS One. 2025; 20(1):e0311755.
11. Saito M, Horie S, Yasuhara H, et al. Metabolomic profiling of urine-derived extracellular vesicles from rat model of drug-induced acute kidney injury. Biochem Biophys Res Commun. 2021; 546:103-110.
12. Shami-Shah A, Travis BG, Walt DR. Advances in extracellular vesicle isolation methods: a path towards cell-type specific EV isolation. Extracell Vesicles Circ Nucl Acids. 2023; 4(3):447-460.
13. Andrianova N.V., Zorova L.D., Pevzner, I.B., et al. Calorie Restriction Provides Kidney Ischemic Tolerance in Senescence-Accelerated OXYS Rats. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15224.
14. Kwon SH, Woollard JR, Saad A, et al. Elevated urinary podocyte-derived extracellular microvesicles in renovascular hypertensive patients. Nephrol Dial Transplant. 2017; 32(5):800-807.
15. Turco AE, Lam W, Rule AD, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. J Extracell Vesicles. 2016; 5:29642.
16. Rigalli JP, Barros ER, Sommers V, et al. Novel Aspects of Extracellular Vesicles in the Regulation of Renal Physiological and Pathophysiological Processes. Front Cell Dev Biol. 2020; 8:244.
17. Grange C, Papadimitriou E, Dimuccio V, et al. Urinary Extracellular Vesicles Carrying Klotho Improve the Recovery of Renal Function in an Acute Tubular Injury Model. Mol Ther. 2024; 32(11):4158-4159. Erratum for: Mol Ther. 2020; 28(2):490-502.

Сигнализация с участием митохондрий. Биоэнергетика

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ РАЗОБЩИТЕЛИ: ФАНТАСТИКА ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ (тезисы доклада)

Антоненко Ю.Н., Котова Е.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Разобщители нарушают запасание энергии в энергопреобразующих мембранах клеток, а именно: внутренней мембране митохондрий, тилакоидных мембранах хлоропластов высших растений и плазматической мембране бактерий, в виде трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов, называемой протон-движущей силой. Разобщители привлекли к себе внимание как возможные средства против ожирения еще до открытия основного механизма их действия, а именно их протонофорной активности, т.е. способности осуществлять циклический перенос протонов через бислойную липидную мембрану, приводящий к диссипации протон-движущей силы. Протонофоры являются частным случаем ионофоров, которые способны к селективному транспорту различных ионов. В настоящее время дизайн, синтез и изучение механизма действия новых разобщителей и ионофоров остается по-прежнему актуальной и интересной задачей. В частности, наряду с классической протонофорной активностью, в действие большинства разобщителей на синтез АТФ и перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий вовлечены некоторые белки внутренней митохондриальной мембраны. В последние годы в нашей лаборатории проводится поиск тканеспецифичных разобщителей, действие которых проявляется в клетках одной ткани, не затрагивая или затрагивая лишь слабо другие ткани. Специфичность такого действия может быть основана на разном профиле экспрессии митохондриальных белков в разных тканях. При этом можно выделить два типа белков, которые обеспечивают тканеспецифичность разобщителей. В первом случае белки сами участвуют в работе разобщителей. Ярким примером такого белка служит транслокатор адениновых нуклеотидов АНТ1, который помогает динитрофенолу (ДНФ) и ряду других разобщителей осуществлять протонофорную активность. Экспрессия АНТ1 в сердце примерно на порядок превосходит таковую в печени, что приводит к усилению разобщающего действия ДНФ на митохондрии сердца. Во втором случае белок может принимать участие в метаболизме некоторых разобщителей,

что приводит к быстрому исчезновению разобщающего действия в соответствующей ткани. Так, фунгицид флуазинам быстро деградирует в митохондриях печени благодаря работе глутатион-S-трансферазы (GST), тогда как в митохондриях сердца разобщающее действие флуазинама стабильно и проявляется в наномолярных концентрациях. Можно привести и другие примеры деградации разобщителей с участием как GST (анилинотиофены), так и митохондриальных эстераз (производные 7-гидроксикумаринов).

АССОЦИИРОВАННЫЕ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ МУТАЦИИ мтДНК ФОРМИРУЮТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП УЧАСТВУЮЩИХ В ПАТОЛОГИИ КЛЕТОК

Винокуров А.Ю.[1], Попов Д.Ю.[1], Погонялова М.Ю.[1], Федотова Е.И.[1,2], Бережнов А.В.[1,2]

[1]Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия
[2]Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия

Введение. Атеросклероз – это патологический процесс, связанный со многими сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая ишемическую болезнь сердца, атеросклероз аорты, заболевания периферических сосудов, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность и инсульт, которые в совокупности являются наиболее распространенной причиной смертности во всем мире [1]. Сегодня атеросклероз характеризуется как комплексный воспалительный процесс, в развитии которого принимают участие разные группы клеток [2,3]. Одной из самых ранних стадий атеросклероза выступает повреждение стенок артерий [4]. Активированные эндотелиальные клетки выступают источниками цитокинов, хемокинов и молекул адгезии, которые способствую миграции лейкоцитов в интиму кровеносных сосудов [5]. В этой связи особое значение приобретают макрофаги, которые в результате поглощения окисленных частиц липопротеинов низкой плотности превращаются в пенистые клетки и участвуют в формировании атеросклеротической бляшки. Как показывает анализ литературы, известная неоднородность популяции макрофагов (поляризация по М1 или М2 фенотипу) может играть ключевую роль в последующем развитии патологии [2,6]. Если преобладание клеток М1 ведет к усугублению патологии, увеличению размеров и дестабилизации бляшек, усилению некроза, то переход клеток в М2 фенотип оказывает обратное действие, что позволяет говорить, соответственно, об атерогенном и антиатерогенном эффектах [7,8]. В последнее время показана связь ряда мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) с атеросклерозом [9-11]. Однако конкретный механизм этого остается малоизученным, что делает актуальными исследования в данном направлении. Одним из возможных объяснений такой взаимосвязи может рассматриваться роль ассоциированных с мутациями изменений

клеточного метаболизма как внутреннего триггера, определяющего направление поляризации макрофагов [12]. В таком случае данные изменения должны быть в значительной степени схожими с известными фенотипическими особенностями, усугубляющими развитие атеросклероза клеток.

Материалы и методы. Для исследования влияния мутаций мтДНК на фенотип клеток в экспериментах использованы линии цитоплазматических гибридов (цибридов), полученные с использованием клеток THP-1 и тромбоцитов пациентов с диагностированным атеросклерозом [13]. Каждая линия характеризуется сочетанием от 5 до 10 мутаций мтДНК в генах 1, 2, 5 и 6 субъединиц комплекса I, цитохрома B, 12S рРНК и тРНК лейцина с различным уровнем гетероплазмии (табл. 1).

Табл. 1. Характеристика использованных в исследовании модельных клеточных линий

Клеточная линия	Виды мутаций и степень их гетероплазмии, %									
	del652G	m.1555A>G	m.3256C>T	m.12315G>A	m.15059G>A	m.14846G>A	m.3336T>C	m.5178C>A	m.13513G>A	m.14459G>A
THP-1	0	15	10	21	1	29	6	17	12	0
TCP	0	26	0	5	0	40	15	0	20	0
TCN	0	28	0	6	0	51	15	0	27	0
TCI	0	24	0	5	0	55	9	0	37	0
HSM1	26	0	50	44	4	32	0	9	24	0
HSM2	22	13	12	19	17	7	7	4	16	7
LSM1	14	17	15	0	4	12	5	0	19	0
LSM2	44	5	8	14	0	6	8	0	33	61
MAM1	23	0	38	23	38	0	4	14	68	0
MAM2	0	0	17	25	26	25	7	17	52	7
MAM3	19	0	29	32	18	36	14	0	24	5
520	0	16	25	1	0	17	37	22	10	0

Показано [14], что часть рассматриваемых мутаций (m.1555A>G в гене *MT-RNR1*, m.14846G>A – *MT-CYTB*, m.13513G>A – *MT-ND5*) носят антиатерогенный, в то время как другие (m.del652G – *MT-RNR1*, m.3256C>T – *MT-TL1*, m.12315G>A – *MT-TL2*, m.15059G>A – *MT-CYTB*, m.3336T>C – *MT-ND1*, m.5178C>A – *MT-ND2*, m.14459G>A – *MT-ND6*) – атерогенный характер. Однако, механизм проявления такого эффекта неясен.

Для комплексного исследования особенностей клеточного метаболизма использованы методы полярографии (скорость потребления клетками кислорода), микроскопии светлого поля (скорость пролиферации клеток), широкопольной флуоресцентной (образование активных форм кислорода (АФК) в цитозоле) и конфокальной (образование митохондриальных АФК (мтАФК), уровень митофагии, колокализации митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭПР), концентрация Ca2+ в цитозоле и митохондриях, уровень некроза, апоптоза, восстановленного глутатиона (GSH), скорость общего перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ПОЛ в митохондриях) микроскопии с применением широкого набора флуоресцентных зондов. В ходе исследований в качестве контроля выступали клетки THP-1.

Результаты. Совокупность имеющихся экспериментальных данных позволяет предположить, что мутации мтДНК могут приводить к изменениям клеточного метаболизма, которые играют роль внутренних триггеров, определяющих направление поляризации макрофагов. Для всех клеток на фоне общего снижения уровня АТФ характерно та или иная степень смещения баланса между образующими АТФ процессами в сторону гликолиза, что находит отражение в меньшем увеличении периода удвоения клеток при развитии на среде без глутамина (все цибриды) или в присутствии блокирующего комплекс V электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий олигомицина А (все цибриды кроме TCP и MAM3), в также в уменьшении скорости потребления митохондриями кислорода, сопряженного с окислительным фосфорилированием (OXPHOS) (все цибриды). На этом фоне в ряде линий значительно увеличена скорость образования АФК в цитозоле (HSM1, HSM2, LSM1), определенная по окислению дигидроэтидия, и матриксе митохондрий (HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2, 520) (окисление MitoTracker Red $CMXH_2ROS$). Стоит отметить, что указанные изменения в редокс-балансе характерны в клетках с преобладанием атерогенных мутаций, а увеличение уровня атерогенных в некоторой степени компенсирует данный эффект (линия MAM3). Если в линиях HSM2, LSM1, LSM2 и 520 отмечено снижение уровня образования H_2O_2, то во всех остальных он статистически значимо повышен, что свидетельствует о различной регуляции активности супероксиддисмутаз. При этом модельные клетки различаются изменением уровня GSH (по интенсивности флуоресценции конъюгатов GSH и монохлорбимана) в цитозоле (цтGSH) и матриксе митохондрий (мтGSH) на фоне выраженной тенденции к росту соотношения мтGSH/цтGSH и снижению скорости ПОЛ, как общего (окисление Bodipy C-11), так и митохондриях (окисление MitoCLox). Таким образом, цибриды не характеризуются состоянием окислительного стресса, что может объясняться увеличением уровня антиоксидантной защиты. Это находит подтверждение и в результатах

оценки гибели клеток по пути как некроза (двойное окрашивание Hoechst 33342 и йодидом пропидия), так и апоптоза (оценка уровня аннексин V-позитивных клеток) – оба параметра находятся в пределах 0,5-5% без значительной корреляции с уровнем мутационной нагрузки. На фоне изменения митохондриальной функции линии характеризуются близкими уровнями митофагии (кроме HSM2, LSM1, LSM2), определенной по пространственной колокализации митохондриально- и лизосомально-направленных флуоресцентных зондов, но при этом в значительной степени сниженным потенциалом к интенсификации процесса путем разобщения внутренней митохондриальной мембраны (FCCP) или закислением цитозоля (инкубирование клеток с пируватом натрия). Это позволяет говорить о том, что влияющие на фенотип клеток мутации мтДНК сохраняются в популяции клеток как ввиду сопоставимой с контролем жизнеспособности последних, так и снижения потенциала процессов, призванных утилизировать дефектные органеллы.

Заключение. Указанные изменения клеточного метаболизма приводятся в литературе как характеризующие провоспалительные макрофаги М1 типа, но в случае исследованных нами экспериментальных моделей формирующиеся не в ответ на внешние стимулы (например, воздействие липополисахарида), а связанные с мутациями мтДНК. Интересно, что ранее показанные как имеющие антиатерогенный характер мутации мтДНК сами по себе не приводят к значительному улучшению метаболизма клеток, но в определенной степени снижают влияние мутаций атерогенного характера. Это показывает сложную взаимосвязь между одновременно присутствующими в клетках повреждениями митохондриального генома, что возможно ввиду одновременно высокого уровня мутагенеза в митохондриях и низкого – процесса репарации повреждений мтДНК. При этом наиболее вероятным объяснением «антиатерогенности» ряда мутаций стоит рассматривать их влияние на уровень влияния атерогенных повреждений мтДНК.

Полученные результаты показывают перспективу регуляции митохондриального метаболизма как инструмента контроля поляризации макрофагов и развития атеросклероза. Однако конкретный набор воздействий (например, применение субстратов цикла Кребса, дыхательной цепи митохондрий, антиоксидантов, в том числе митохондриально направленных) должен определяться имеющимся в клетках набором мутаций мтДНК и уровнем их тегероплазмии, что подчеркивает высокую актуальность индивидуального подхода к коррекции течения патологии, который является важнейшей составляющей персонализированной медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317П.

ЛИТЕРАТУРА

1. Luca AC, David SG, David AG, et al. Atherosclerosis from Newborn to Adult—Epidemiology, Pathological Aspects, and Risk Factors. *Life*. 2023;13(10):2056. doi:10.3390/life13102056
2. Forteza MJ, Ketelhuth DFJ. Metabolism in atherosclerotic plaques: Immunoregulatory mechanisms in the arterial wall. *Clinical Science*. 2022;136(8):435-454. doi:10.1042/CS20201293
3. Montarello NJ, Nguyen MT, Wong DTL, Nicholls SJ, Psaltis PJ. Inflammation in Coronary Atherosclerosis and Its Therapeutic Implications. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2022;36(2):347-362. doi:10.1007/s10557-020-07106-6
4. Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9):7910. doi:10.3390/ijms24097910
5. Jia M, Li Q, Guo J, et al. Deletion of BACH1 Attenuates Atherosclerosis by Reducing Endothelial Inflammation. *Circulation Research*. 2022;130(7):1038-1055. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.319540
6. Kloc M, Uosef A, Kubiak JZ, et al. Role of Macrophages and RhoA Pathway in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22:216.
7. Gianopoulos I, Daskalopoulou SS. Macrophage profiling in atherosclerosis: understanding the unstable plaque. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(1):35-56. doi:10.1007/s00395-023-01023-z
8. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2013;22(7):910-918. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.11.020
9. Dabravolski SA, Khotina VA, Sukhorukov VN, Kalmykov VA, Mikhaleva LM, Orekhov AN. The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(2):952. doi:10.3390/ijms23020952
10. Bezsonov EE, Sobenin IA, Orekhov AN. Immunopathology of atherosclerosis and related diseases: Focus on molecular biology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(8):4080. doi:10.3390/ijms22084080
11. Cai Z, Li W, Brenner M, Bahiraii S, Heiss EH, Weckwerth W. Branched-chain ketoacids derived from cancer cells modulate macrophage polarization and metabolic reprogramming. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:966158. doi:10.3389/fimmu.2022.966158
12. Fedotova EI, Berezhnov A V, Popov DY, Shitikova EY, Vinokurov AY. The Role of mtDNA Mutations in Atherosclerosis: The Influence of Mitochondrial Dysfunction on Macrophage Polarization. *International journal of molecular sciences*. 2025;26(3):1019. doi:10.3390/ijms26031019
13. Sazonova MA, Sinyov V V., Ryzhkova AI, et al. Cybrid models of pathological cell processes in different diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4647214
14. Sazonova MA, Kirichenko T V, Ryzhkova AI, et al. Variability of Mitochondrial DNA Heteroplasmy: Association with Asymptomatic Carotid Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2024;12(8). doi:10.3390/biomedicines12081868

ИНГИБИРОВАНИЕ ДЫХАНИЯ И ЦИКЛА КРЕБСА ПИРУВАТОМ

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Российской академии наук
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино, Россия

Введение. При окислении пирувата или ацилкарнитинов переход митохондриального дыхания из состояния 2 (без ADP) в состояние 3 (ADP + гексокиназа) приводит к снижению отношений ATP/ADP, NADH/NAD и Ацетил-КоА/КоА в несколько раз, обеспечивая увеличение скоростей реакций цикла Кребса и окислительного фосфорилирования (OXPHOS) за счет вовлечения соответствующих кофакторов в аллостерического контроля пируват дегидрогеназного (PDH) и α-кетоглутарат дегидрогеназного (α-KGDH) комплексов, изоцитратдегидрогеназы (IDH) и др. [1-4] и, таким образом, обеспечивая соответствие продукции и потребления ATP. Однако, наряду с мгновенным (быстрым) субстратным и аллостерическим контролем реакций цикла Кребса и OXPHOS, медленные динамические циклы посттрансляционной модификации (ПТМ) с участием фосфорилирования/дефосфорилирования и ацетилирования/деацетилирования белков-мишеней также могут играть важную роль в регуляции активности различных клеточных метаболических и сигнальных систем [5-7]. В 1969 году было обнаружено, что активность PDH комплекса контролируется киназой (PDK) и фосфатазой (PDP); фосфорилирование PDH ингибируется ADP, пируватом и неорганическим фосфатом (Pi); дефосфорилирование активируется кальцием [8]. Вскоре было показано, что PDK уменьшает активность PDH, фосфорилируя α-субъединицу (декарбоксилазу E1) мультиферментного комплекса [9] и что ингибирующее действие ADP и пирувата на PDK носит синергетический эффект [10-12], который обусловлен образованием тупикового комплекса ADP и пирувата с PDK [12]. Такое ингибирование PDK, обеспечивающее преимущество дефосфорилирования PDH с участием PDP, играет важную роль в медленной активации PDH и увеличении энергопродукции при переходе мышц от покоя к работе. Наряду с пируватом, киназы PDK ингибируются дихлорацетатом (DCA), что находит применение в клинической практике при лечении, например, лактатного ацидоза и ожирения [13]. В отличие от фосфорилирования, ацетилирование различных белков-мишеней выражено повсеместно. Однако, только 3-4% из них имеют функциональное значение, оказывая ингибирующий эффект [5]. По-

видимому, неферментативное ацетилирование может способствовать этому нецеленаправленному эффекту [14]. В число подверженных ацетилированию митохондриальных белков входят PDH, глутаматдегидрогеназа (GDH) и большинство ферментов цикла Кребса, включая: α-KGDH, комплексы белков дыхательной цепи (Комплексы I-IV) и F0-F1-синтазу (Комплекс V) [5,6]. Функциональный эффект PDH-опосредованного ацетилирования и ингибирования α-KGDH в присутствии пирувата (или ацетил-КоА) продемонстрирован только недавно [15]. В контексте регуляции OXPHOS и цикла Кребса, вклад этого типа ПТМ в общий метаболический контроль требует дальнейшего изучения. В данной работе предпринята попытка исследовать быстрые и медленные эффекты, связанные с регуляцией дыхания и цикла Кребса посредством Ацетил-КоА при активации PDH комплекса избытком пирувата.

Методы, материалы и статистический анализ. Все процедуры на животных (самцы крыс Вистар) выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и одобрены комитетом по этике ИТЭБ РАН (Протокол № 28.2024 от 18.03.2024). Использованы стандартные методы выделения митохондрий печени, описанные ранее [16]. Данные анализировали с помощью парного *t*-критерия и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Значимыми считали различия при $p < 0.05$. Количество экспериментов (n) указано на соответствующих рисунках. В работе использовали реактивы Sigma (США) и Tocris (Великобритания).

Результаты. В экспериментах использованы естественные субстраты цикла Кребса: доноры ацетильных групп (Ацетил-КоА) пируват (Pyr) и *D,L*-ацетилкарнитин (AcCar), а также источник пополнения интермедиатов цикла Кребса *L*- глутамат (Glut). Все эти метаболиты могут транспортироваться в крови и поступать из клетки в клетку. В некоторых экспериментах также использованы интермедиаты цикла сукцинат (Succ), малат (Mal) и α-кетогутарат (KG). Наличие этих интермедиатов в среде инкубации митохондрий приводит к фиксации (клямп) уровней соответствующих интермедиатов в матриксе.

Влияние избытка пирувата на скорость дыхания в состоянии 3 при окислении пирувата и глутамата. На Рис. 1А показаны полярографические кривые (pO_2) и записи митохондриального потенциала $\Delta\psi_m$ (TPP^+), полученные при преинкубация митохондрий с 1, 15 и 30 мМ пирувата, в присутствии 10 мМ *L*-глутамата. При 1 мМ пирувата в среде, ADP вызывает максимальную стимуляцию скорости дыхания VO_2 (100%), которая увеличивается до 164 % при последующей добавке 3 мМ малата (Mal 3). Избыток пирувата в среде (15 и 30 мМ) приводит к концентрационно-зависимому ингибированию дыхания и снижению потенциала $\Delta\psi_m$. Ингибирующий эффект также зависит от времени

инкубации. Скорости дыхания VO_2 после добавки ADP (в состоянии 3) уменьшается от 70, 63 до 47% и от 50, 43 до 23% при инкубации с 15 и 30 мМ пирувата, соответственно. Добавленный малат (Mal) реактивирует дыхание и частично увеличивает потенциал $\Delta\psi_m$, однако максимальная скорость дыхания не достигает 164% (VO_2 при 1 мМ пирувата).

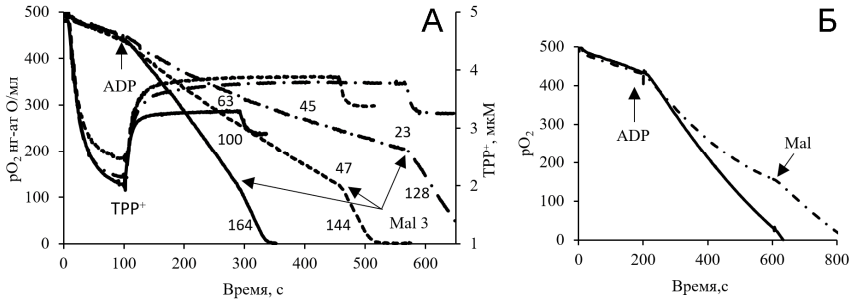


Рис. 1. Концентрационно-зависимое влияние пирувата на дыхание и мембранный потенциал $\Delta\psi_m$ (TPP+) митохондрий печени крыс и эффект дихлорацетата (DCA) на дыхание. На панели А показаны три репрезентативных полярографических следа [pO_2], характеризующих ингибирование дыхания пируватом. Митохондрии печени крыс (1 мг) инкубировали в закрытой камере объемом 1 мл в среде, содержащей гексокиназу, 10 мМ глюкозу, 10 мМ *L*-глутамата (Glut) и от 1 до 30 мМ пирувата (Pyr). ADP (0,75 мМ) добавляли при времени инкубации 100 сек. Сплошными, пунктирными и штрих-пунктирными линиями показаны эксперименты выполненные при 1, 15 и 30 мМ пирувата соответственно. Ингибирование устранялось добавками 3 мм *L*-малата (Mal, стрелки). Цифрами на полярографических кривых показаны текущие величины скорости дыхания VO_2 в % от VO_2 = 83 нг-ат О/мин/мг мит. пр. (VO_2 = 100%) при 1 мМ пирувата в среде. На панели Б показано влияние 1 мМ DCA на дыхание при наличии 2 мМ пирувата и 10 мМ *L*-глутамата в среде.

Влияние ингибитора PDK дихлорацетата (DCA). На Рис. 1Б показано, что DCA (1 мМ) при наличии 2 мМ пирувата в среде, также как избыток (5-30 мМ) пирувата вызывает подавление дыхания митохондрий, развивающееся во времени. Такое медленное развитие во времени подавления дыхания в присутствии избытка пирувата (плюс ADP) или DCA может указывать на сходный механизм действия. Такой механизм может быть связан с ингибированием PDK, медленной активацией PDH при ее дефосфорилировании с участием PDP, приводящей к избыточной продукции Ацетил-КоА.

Ацетилкарнитин, также как и пируват, ингибирует дыхание митохондрий в присутствии глутамата. Ацетилкарнитин (AcCar), превращаясь в Ацетил-КоА, окисляется в митохондриях,. В присутствии

3 мМ AcCar и 10 мМ глутамата в среде скорость дыхания митохондрий более чем в 2 раза выше чем при наличии 20 мМ AcCar (Рис. 2А, VO_2: 100% *vs.* 44%). Добавленный малат (Mal) также реактивирует дыхание. Однако, в отличие от эффекта пирувата, ингибирование дыхания, наблюдающееся в присутствии ADP, не зависит от времени. После активации дыхания ADP скорость VO_2 постоянна. Это может быть связано с тем, что ферменты, участвующие в регуляции окисления пирувата (PDH/PDK/PDP) не вовлечены в процесс окисления AcCar. Увеличение времени преинкубации митохондрий с AcCar от 100 до 600 сек также несколько усиливает ингибирующий эффект избытка AcCar (не показано; VO_2: 48% *vs.* 34%).

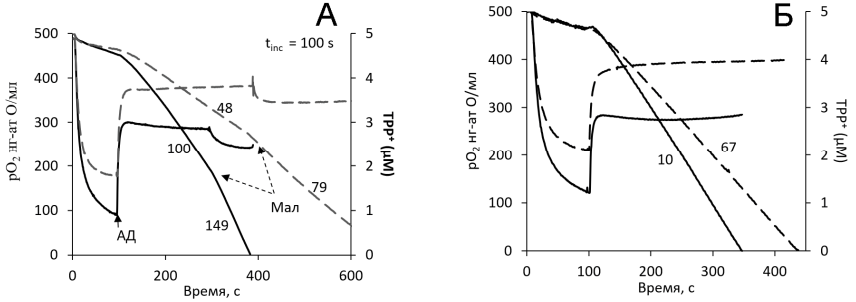


Рис. 2. Подавление митохондриального дыхания и потенциала $\Delta\psi_m$ избытком ацетилкарнитина (AcCar) в присутствии 10 мМ *L*-глутамата (панель А) или 10 мМ сукцината и 3 мкм ротенона (панель Б). Сплошные и пунктирные линии соответствуют наличию 3 и 20 мМ AcCar в среде. Остальные обозначения и условия инкубации как на Рис. 1.

Ацетилкарнитин, также как и пируват, ингибирует дыхание митохондрий при окислении сукцината. В присутствии ротенона, блокатора I комплекса дыхательной цепи, AcCar не может окисляться в митохондриях. Однако, даже при таких условиях, 20 мМ AcCar вызывает подавление дыхания на 37 % (Рис. 2В, VO_2: 100% *vs.* 67%) при времени преинкубации в 100 сек в состоянии 2. Скорость дыхания в состоянии 3 VO_2 также постоянна. Увеличение времени преинкубации митохондрий от 100 до 600 сек заметно усиливает ингибирующее действие 20 мМ AcCar (не показано; VO_2: 100% *vs.* 40%).

Пируват и ацетилкарнитин ингибируют дыхание митохондрий при низких концентрациях малата и α-кетоглутарата в среде. На рисунках 3А и 3Б показано, что концентрационно-зависимое ингибирование дыхания митохондрий избытком пирувата и AcCar сохраняется при наличии низких концентраций (до 1 мМ) малата и α- кетоглутарата в среде.

При высоких концентрациях этих интермедиатов цикла Кребса (3 мМ и выше) ингибирование исчезает и имеет место активация цикла в присутствии больших концентраций источников Ацетил-КоА (Рис. 3В).

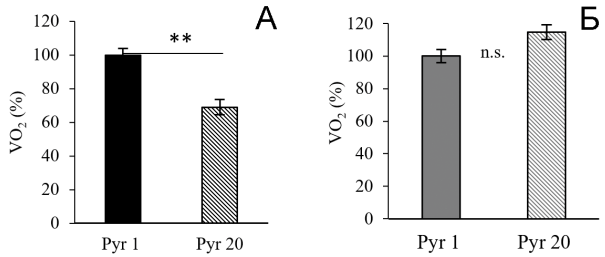


Рис. 3. Ингибирование дыхания пируватом и ацетилкарнитином предотвращается при высоких концентрациях *L*-малата (Mal) и α-кетоглутарата (KG) в исходной инкубационной среде. Столбцы на панелях представляют средние значения VO_2. Все субстраты указаны в мМ. На панели А показано ингибирование дыхания избытком пирувата при низких концентрациях 0.5 мМ Mal и α- KG в качестве ко-субстратов. На панели Б показано, что преинкубация митохондрий с избытком L-малата и α-кетоглутарата (по 3 мМ) устраняет индуцированное пируватом угнетение дыхания. Контрольные значения VO_2 = 59 нг-ат О/мин/мг мит.пр. (панель А) и 129 нг-ат О/мин/мг мит.пр. (панель Б) принимались за 100%. (n = 6, парный *t*-критерий, значимыми считали различия при $p < 0.05$). Представлены средние величины ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Обсуждение. Цитратсинтаза (CS) ингибируется своим субстратом Ac-CoA при низких микромолярных концентрациях второго субстрата оксалоацетата (OAA) [17,18]. Поэтому можно предположить участие CS в ингибировании дыхания и цикла Кребса избытком пирувата (или AcCar) при низких концентрациях OAA (и других интермедиатов цикла, образующихся при окислении глутамата в GDH реакции. α-KGDH, как известно, очень чувствительна к различным ацил-КоА, включая бутирил-CoA (C4) [19,20]. Данных о влиянии Ac-CoA на α-KGDH нет. Однако митохондрии клеток печени имеют активную C4-тиолазу, участвующую в синтезе кетоновых тел. Поэтому, можно предположить, что α-KGDH может ингибироваться как AcCoA, так и/или ацетоацетил-КоА (AcAcCoA), который образуется из двух молекул Ac-CoA при окислении пирувата или AcCar. Ингибирование CS посредством AcCoA, а также α-KGDH с участием Ac-CoA или AcAcCoA, может обеспечить ингибирование всего цикла Кребса и наблюдаемое подавление дыхания митоходрий, реактивируемое добавленным малатом (Рис. 1 и 2). Такой аллостерический эффект снимается при больших концентрациях интермедиатов цикла малата и α-кетоглутарата в исходной среде (Рис. 3), что свидетельствует в пользу предлагаемого механизма.

Ингибирование дыхания избытком пирувата развивается медленно. Скорость дыхания VO2 снижается в течение нескольких сотен секунд (Рис. 1А). Эффект воспроизводится в присутствии ингибитора киназы PDK дихлорацетата (DCA; Рис. 1Б) и не наблюдается при избытке ацетилкарнитина (AcCar; Рис. 2), что указывает на вовлечение PDP в дефосфорилирование PDH при ингибировании PDK пируватом (и ADP) или DCA. Медленное увеличение активной (дефосфорилированной) формы PDH и обеспечивает избыточную продукцию Ac-CoA, ингибирование цикла Кребса и дыхания митохондрий. При избытке AcCar, не зависящее от отношений NADH/NAD и AcCoA/CoA в митохондриях накопление AcCoA, происходит еще в состоянии 2. Поэтому, в состоянии 3 (при добавках ADP) скорость дыхания VO2 постоянна (AcCar; Рис. 2). Наблюдаемые эффекты пирувата и AcCar также зависят от времени преинкубации митохондрий с этими источниками AcCoA (Рис. 2). Временной эффект преинкубации митохондрий с AcCar сильно выражен при окислении сукцината в присутствии ротенона (Рис. 2в и 2Г). В присутствии ротенона, блокатора I комплекса дыхательной цепи, AcCar не может окисляться в митохондриях и имеет место накопление NADH. Поэтому, учитывая зависимость эффекта AcCar от времени преинкубации, можно допустить, что наряду с быстрым аллостерическим ингибированием различных ферментов-мишеней в данный эффект может быть вовлечено и медленное ацетилирование SDH и других митохондриальных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. LaNoue KF, Bryla J, Williamson JR. Feedback interactions in the control of citric acid cycle activity in rat heart mitochondria. J Biol Chem. 1972; 247(3):667–679, doi.org/10.1016/S0021–9258(19)45660–3.
2. Hansford RG, Johnson RN. The steady state concentrations of coenzyme A-SH and coenzyme A thioester, citrate, and isocitrate during tricarboxylate cycle oxidations in rabbit heart mitochondria. J Biol Chem. 1975; 250(21):8361–8375, doi.org/10.1016/S0021–9258(19)40767–9.
3. Ashour B, Hansford RG. Effect of fatty acids and ketones on the activity of pyruvate dehydrogenase in skeletal-muscle mitochondria. Biochem J. 1983; 214(3):725–36, doi: 10.1042/bj2140725.
4. Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems FEBS Lett. 1980; 117, Suppl, K73–85, doi: 10.1016/0014–5793(80)80572–2.
5. Baeza J, Smallegan MJ, Denu JM. Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. Trends Biochem Sci. 2016; 41(3):231–244, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.006.
6. Carrico C, Meyer JG, He W, Gibson BW, Verdin E. The Mitochondrial Acylome Emerges: Proteomics, Regulation by Sirtuins, and Metabolic and Disease Implications.

Cell Metab. 2018; 27(3):497–512, doi: 10.1016/j.cmet.2018.01.016.
7. Bak S, León IR, Jensen ON, Højlund K. Tissue specific phosphorylation of mitochondrial proteins isolated from rat liver, heart muscle, and skeletal muscle. J Proteome Res. 2013; 12(10): 4327–4339, doi: 10.1021/pr400281r.
8. Linn TC, Pettit FH, Reed LJ. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969; 62(1):234–241, doi: 10.1073/pnas.62.1.234.
9. Yeaman SJ, Hutcheson ET, Roche TE, Pettit FH, Brown JR, Reed LJ, Watson DC, Dixon GH. Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. Biochemistry. 1978; 17(12):2364–2370, doi: 10.1021/bi00605a017.
10. Hucho F, Randall DD, Roche TE, Burgett MW, Pelley JW, Reed LJ. Keto acid dehydrogenase complexes. XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine kidney and heart. Arch Biochem Biophys. 1972; 151(1):328–340, doi: 10.1016/0003–9861(72)90504–8.
11. Kerbey AL, Randle PJ, Cooper RH, Whitehouse S, Pask HT, Denton RM. Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. Biochem J. 1976; 154(2): 327–348, doi: 10.1042/bj1540327.
12. Roche TE, Cate RL. Evidence for lipoic acid mediated NADH and acetyl-CoA stimulation of liver and kidney pyruvate dehydrogenase kinase. Biochem Biophys Res Commun. 1976; 72(4):1375–83, doi: 10.1016/s0006–291x(76)80166–0.
13. Schoenmann T, Tannenbaum THM, Rajub RP. Regulating mitochondrial metabolism by targeting pyruvate dehydrogenase with dichloroacetate, a metabolic messenger Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2023; 1869(7): 166769. doi:10.1016/j.bbadis.2023.166769
14. Wagner GR, Payne RM. Widespread and enzyme-independent Nε-acetylation and Nε-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. J Biol Chem. 2013; 288(40):29036–29045, doi: 10.1074/jbc.M113.486753.
15. Sun L, Bhawal R, Xu H, Chen H, Anderson ET, Haroutunian V, Cross AC, Zhang S, Gibson GE. The human brain acetylome reveals that decreased acetylation of mitochondrial proteins associates with Alzheimer's disease. J Neurochem. 2021; 158(2):282–296, doi: 10.1111/jnc.15377.
16. Fedotcheva NI, Grishina EV, Dynnik VV. Involvement of the Mitochondrial Ca2+-Independent Phospholipase iPLA2 in the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Long-Chain Acylcarnitines ISSN 1990-7478, Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2023; 17(4):325–331. DOI: 10.1134/S1990747823050045
17. Johansson CJ, Pettersson G. Substrate-inhibiton by acetyl-CoA in the condensation reaction between oxaloacetate and acetyl-CoA catalyzed by citrate synthase from pig heart. Biochim Biophys Acta. 1977; 484(1): 208–215, doi: 10.1016/0005–2744(77)90126–7.
18. Johansson CJ, Pettersson G. Inhibition of pig-heart citrate synthase by carboxylic

acids structurally related to oxaloacetate. Eur J Biochem. 1979; 93(3):505–513, doi: 10.1111/j.1432–1033.1979.tb12849.x.
19. Lai JC, Cooper AJ. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. Neurochem Res. 1991; 16(7):795–803, doi: 10.1007/BF00965689.
20. Lai JC, Liang BB, Zhai S, Jarvi EJ, Lu DR. Brain mitochondrial citrate synthase and glutamate dehydrogenase: differential inhibition by fatty acyl coenzyme A derivatives. Metab Brain Dis. 1994; 9(2):143–52, doi: 10.1007/BF01999767

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК КАК СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ: ОТ КЛЕТОЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ К СИСТЕМНОМУ ВОСПАЛЕНИЮ

Гуреев А.П.[1], Нестерова В.В.[1], Бабенкова П.И.[1], Грибовская В.А.[1], Аджемян Д.С.[1], Иванов М.Э.[2], Плотников Е.Ю.[3], Силачев Д.Н.[3]

[1]Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
[2]Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, Москва, Россия
[3]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Введение. В отличие от большинства неврологических заболеваний, развивающихся преимущественно в пожилом возрасте, черепно-мозговые травмы (ЧМТ) представляют важное исключение, поскольку могут возникать у пациентов любой возрастной группы – и у младенцев, и у лиц трудоспособного возраста [1]. Согласно статистическим данным, в Российской Федерации на долю внутричерепных травм среди взрослого населения приходится около 2,5% от общего числа травматических повреждений [2]. Патогенез ЧМТ включает два основных компонента повреждений. Первичные нарушения, обусловленные непосредственным механическим воздействием, проявляются диффузными аксональными повреждениями, образованием гематом, нарушением целостности гематоэнцефалического барьера и расстройствами мозгового кровотока [3]. Вторичные повреждения характеризуются сложным каскадом патологических процессов, среди которых особое значение имеют митохондриальные дисфункции. В первые часы после травмы деполяризация нейронов приводит к массивному выбросу возбуждающих нейротрансмиттеров, что вызывает значительное увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Этот процесс, в свою очередь, опосредует развитие различных митохондриальных нарушений [4]. Дисбаланс между прооксидантными и антиоксидантными системами митохондрий индуцирует окислительный стресс, способный вызывать повреждение различных митохондриальных и клеточных структур. Эти изменения не только усугубляют вторичные повреждения, но и могут служить патогенетической основой для развития других нейродегенеративных процессов, включая инсульт [5] и болезнь Альцгеймера [6].

Считается, что одним из самых чувствительных компонентов митохондрий является митохондриальная ДНК (мтДНК), которая расположена в митохондриальном матриксе, то есть в непосредственной

близости к источнику активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, она не защищена гистонами и имеет ограниченное количество систем репарации по сравнения с ядерной ДНК [7]. При этом на данный момент нет четкого понимания, какие изменения в структурной целостности мтДНК мозга происходят на фоне ЧМТ. Количество разрывов в цепи мтДНК не было исследовано, и лишь незначительное число работ посвящено изучению делеций мтДНК. В исследованиях Lifshitz и McIntosh [8] после ЧМТ не было обнаружено увеличения количества делеций мтДНК. Авторы предположили, что это связано с протоколом получения препарата изолированных митохондрий, при котором могли быть элиминированы митохондрии, несущие повреждения мтДНК [8]. Другое исследование на *post mortem* образцах мозга человека также не выявило увеличения количества делеций мтДНК после ЧМТ [9], но такой тип анализа сопряжен с определенными сложностями, связанными с деградацией мтДНК, которая начинается уже спустя 4-6 минуты после смерти [10].

Кроме того, в ответ на разные внешние факторы может происходить изменение количества митохондрий, о чем косвенно можно судить по количеству копий мтДНК. С одной стороны, уменьшение содержания мтДНК может быть вызвано подавлением митохондриального биогенеза, а с другой стороны, деградацией мтДНК как внутри митохондрии, так и митофагии, то есть полного разрушения повреждённых митохондрий [11]. Целью данного исследования являлась оценка влияния экспериментально индуцированной ЧМТ на изменения в структурной целостности и количестве мтДНК в поврежденном регионе мозга и плазме крови.

Материалы и методы. ЧМТ индуцировали методом CCC (controlled cortical impact). Наркотизированным мышам разрезали кожу на голове и делали отверстие в черепе 4 мм. ЧМТ проводили на стереотаксическом импакторе 68099II Precise Impactor (RWD, Китай) в правое полушарие бойком диаметром 3 мм. Глубина удара составляла в разных экспериментах от 0,8 до 1,6 мм. Далее накладывали швы хирургической иглой, раны обрабатывали фукорцином. После операции температуру отслеживали с помощью ректального термодатчика и поддерживали в диапазоне 36-37 °C путем нагревания мышей с помощью инфракрасных ламп. Количество копий мтДНК в мозге и плазме, а также количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-Rad CFX96^{TM} Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием готовой смеси 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Ложно-оперированные животные (группа Sham) подвергалась только краниотомии без удара бойком.

Результаты и обсуждение. На первом этапе была произведена оптимизация силы удара, которая, с одной стороны, приводила бы к

нулевой или минимальной смертности, а с другой стороны, вызывала бы стабильные очаги поражения и наибольшие нарушения в гомеостазе мтДНК. Удар бойком в мозг через отверстие в черепе вызывал значительные повреждения коры мозга и строго коррелировал с глубиной удара импактора. При ударе на глубину 0,8 мм, 1,2 мм и 1,6 мм объем очага поражения составлял соответственно 9,28 ± 0,63 мм³, 16,52 ± 4,11 мм³ и 26,13 ± 3,50 мм³ (рис. 1А-В). Нормализованное количество копий мтДНК у контрольных мышей составляло 3,91 ± 0,28. При ударе на глубину 0,8 мм количество снизилось до 2,73 ± 1,09, но различия не было статистически достоверны. При ударе на глубину 1,2 мм и 1,6 мм количество копий мтДНК было снижено до 1,90 ± 0,56 и 1,15 ± 0,42, соответственно (оба p <0,05) (рис. 1Г). Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) между объёмом очага поражения и количеством копий мтДНК в поврежденном регионе мозга составил –0,53, при значении достоверности p <0,05.

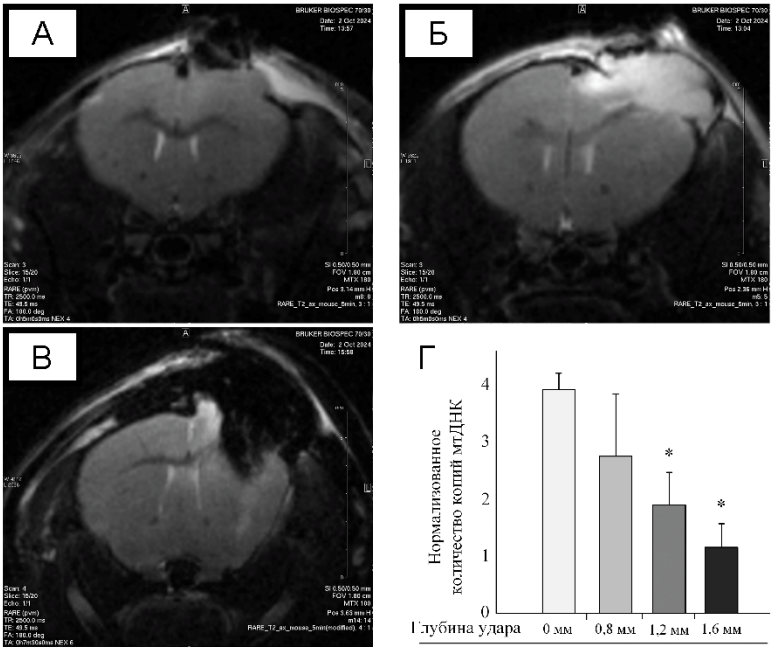


Рис. 1. Объем очага поражения при глубине погружения бойка на 0,8 мм (А), 1,2 мм (Б), 1,6 мм (В), а также нормализованное количество копий мтДНК при различной силе удара в сравнении с контролем (все n = 4) (Г). Различия статистически достоверны *p <0,05 (критерий Манн-Уитни)

Стоит отметить, что количество копий мтДНК снижается именно вследствие нанесенного удара. Так, в следующем эксперименте в группе Sham не наблюдалось статистически-значимого снижения количества копий мтДНК после краниотомии, тогда как при ЧМТ (глубина удара 1,2 мм) количество копий мтДНК было снижено в 3,5 раза. Но при этом процедура краниотомии вызывала увеличение уровня повреждений мтДНК (+ 26% по сравнение с контролем, p <0,05). ЧМТ усугубляла повреждения мтДНК (+35% по сравнению с контролем, p <0,001), но не было различий между группой Sham и группой мышей, подвергавшихся ЧМТ (рис. 2А).

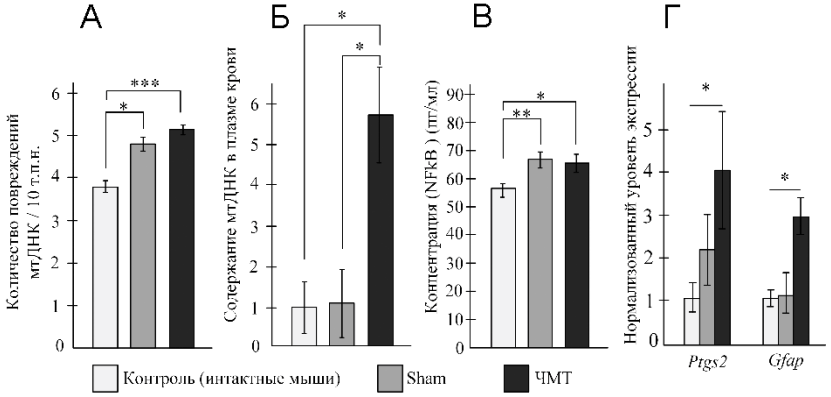


Рис. 2. Влияние краниотомии и ЧМТ на количество повреждений мтДНК (А), содержание мтДНК в плазме крови (Б), концентрация провоспалительного маркера в плазме крови (В), нормализованный уровень экспрессии провоспалительных маркеров в крови (Г). (все n = 10). Различия статистически достоверны *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 (критерий Краскела-Уоллиса)

Это достаточно распространенная проблема, при экспериментальном моделировании ЧМТ. Контрольная группа, как правило, тоже подвергается краниотомии, что есть так называемой ложной операции (англ. “sham”). При этом в исследовании Cole et al. (2011) отмечалось, что только в 4% от общего числа экспериментальных работ, связанных с моделированием ЧМТ у грызунов, использовались помимо ложно-оперированных еще и полностью интактные животные, которые не подвергались никакому воздействию. В том же исследовании Cole et al. (2011) было показано, что сама по себе любая процедура краниотомии (даже без последующего удара) вызывает значительные повреждения в мозге, который сопровождаются значительными когнитивными дефицитами, вызванными, в первую очередь, усилением воспалительных процессов в месте физического воздействия на мозговые оболочки [12].

ЧМТ, но не краниотомия также вызывала увеличение уровня свободно-циркулирующей мтДНК (сц-мтДНК) в плазме крови ($p < 0,05$) (рис. 2Б). Сц-мтДНК может функционировать как молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждениями (DAMP), который способен индуцировать процессы, приводящие к воспалительным реакциям и повреждениям органов. Ранее было показано, что повышенный уровень сц-мтДНК наблюдается при различных внутренних травмах [13], и его можно использовать в качестве молекулярного паттерна для оценки вероятности летального исхода при остром коронарном синдроме [14]. При этом мы показали, что процедура краниотомии без последующего удара вызывала увеличение в плазме крови содержания провоспалительного цитокина NFκB (рис. 2В). При этом увеличение экспрессии *Gfap* как в мозге, так и в крови, было отмечена только в группе мышей, которые подвергались ЧМТ, но не краниотомии. Это позволяет предположить, что уровень транскриптов гена *Gfap* можно рассматривать как вполне надежный маркер воспаления именно после ЧМТ, а не просто только нарушения целостности черепа. Аналогично была увеличена экспрессия гена *Ptgs2*. Увеличение экспрессии гена данного гена (кодирующего циклооксигеназу-2) свидетельствует об активации провоспалительных путей, в частности, синтеза простагландинов, что характерно для нейровоспалительного ответа на повреждение ткани мозга (рис. 2Г).

Проведенные эксперименты демонстрируют существенные изменения целостности и функциональности митохондриальной ДНК при экспериментальном моделировании ЧМТ у мышей. Установлено, что количество повреждений мтДНК значительно возрастает уже при проведении краниотомии, однако дополнительное механическое воздействие приводит лишь к незначительному дальнейшему увеличению степени повреждений. В то же время, только в группе с ЧМТ наблюдалось статистически значимое снижение количества копий мтДНК, коррелирующее с объемом очага поражения. Важным результатом исследования является обнаружение повышенного содержания свободно циркулирующей мтДНК в плазме крови после ЧМТ, что свидетельствует о выходе данной молекулы из поврежденных клеток в кровоток. Полученные данные позволяют рассматривать количественные и качественные показатели мтДНК в качестве перспективных биомаркеров для оценки тяжести травматического повреждения мозга и мониторинга эффективности терапевтических вмешательств.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 24-74-00149).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dumurgier J, Tzourio C. "Epidemiology of neurological diseases in older adults." Rev Neurol (Paris). 2020;176(9):642-648. doi:10.1016/j.neurol.2020.01.356
2. Dubinin IP, Plupnitskiy AN, Karimov BN, Latyshova AA. "[Features of prehospital stage organization of neurotraumatological care for patients with acute traumatic brain injuries: the example of Moscow]." Curr Probl Health Care Med Stat. 2024;(1):696-709. doi:10.24412/2312-2935-2024-1-696-709
3. Butkova TV, Malsagova KA, Nakhod VI, Petrovskiy DV, Izotov AA, Balakin EI, et al. "Candidate molecular biomarkers of traumatic brain injury: a systematic review." Biomolecules. 2024;14(10):1283. doi:10.3390/biom14101283
4. Mira RG, Quintanilla RA, Cerpa W. "Mild traumatic brain injury induces mitochondrial calcium overload and triggers the upregulation of NCLX in the hippocampus." Antioxidants (Basel). 2023;12(2):403. doi:10.3390/antiox12020403
5. Cheng G, Kong R, Zhang L, Zhang J. "Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies." Br J Pharmacol. 2012;167(4):699-719. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02025.x
6. Isaev NK, Genrikhs EE, Stelmashook EV. "Methylene blue and its potential in the treatment of traumatic brain injury, brain ischemia, and Alzheimer's disease." Rev Neurosci. 2024;35(5):585-595. doi:10.1515/revneuro-2024-0007
7. Gureev AP, Nesterova VV, Sadovnikova IS. "Long-range PCR as a tool for evaluating mitochondrial DNA damage: Principles, benefits, and limitations of the technique." DNA Repair (Amst). 2025;146:103812. doi:10.1016/j.dnarep.2025.103812
8. Lifshitz J, McIntosh TK. "Age-associated mitochondrial DNA deletions are not evident chronically after experimental brain injury in the rat." J Neurotrauma. 2003;20(2):139-149. doi:10.1089/08977150360547062
9. McDonald RP, Horsburgh KJ, Graham DI, Nicoll JA. "Mitochondrial DNA deletions in acute brain injury." Neuroreport. 1999;10(9):1875-1878. doi:10.1097/00001756-199906230-00014
10. Thomas M, Gilbert P. "Postmortem damage of mitochondrial DNA." In: Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. Nucleic Acids and Molecular Biology. 2005;18:91-115.
11. Luan Y, Jiang L, Luan Y, Xie Y, Yang Y, Ren KD. "Mitophagy and Traumatic Brain Injury: Regulatory Mechanisms and Therapeutic Potentials." Oxid Med Cell Longev. 2023;2023:1649842. doi:10.1155/2023/1649842
12. Cole JT, Yarnell A, Kean WS, et al. "Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham?" J Neurotrauma. 2011;28(3):359-369. doi:10.1089/neu.2010.1427
13. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." Nature. 2010;464(7285):104-107. doi:10.1038/nature08780
14. Sudakov NP, Apartsin KA, Lepekhova SA, et al. "The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome." Eur J Med Res. 2017;22(1):25. doi:10.1186/s40001-016-0241-x

АМБИОЛ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К ДЕЙСТВИЮ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Жигачева И.В.[1], Крикунова Н.И.[1], Миль Е.М.[1], Голощапов А.Н.[1], Расулов М.М.[2]

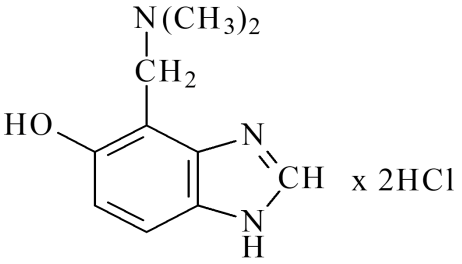
[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, Россия

Введение. Бензимидазол азотсодержащие ароматическое гетероциклическое соединение в структуру которого входят сопряженные кольца бензола и имидазола.

Его производные, так же как производные имидазола, являются структурными элементами многих природных соединений и современных лекарственных препаратов [1]. Широкое фармакологическое применение бензимидазола обусловлено его физико-химическими свойствами а именно: эффективностью донорно-акцепторных водородных связей, π-π- и гидрофобными взаимодействиями, что позволяет производным бензимидазола эффективно связываться с макромолекулами [2]. Бензимидазол и его производные играют огромную роль в жизни всех живых существ: участвуют в построении и превращениях нуклеиновых кислот [3], многих белков, в том числе глобинов [4]. Они обладают противоопухолевым, противовирусным, антибактериальным, антилейкозным, и кардиопротекторным действием [5]

Кроме того, производные бензимидазола в настоящее время используются в синтезе различных полимеров и красителей, что говорит об актуальности их исследования [6].

К производным бензимидазола относится и регулятор роста растений амбиол -(2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол-дигидрохлорид):



Показано, что амбиол повышает устойчивость растений к абиотическим стрессовым факторам. Он способствует выработке неспецифического иммунитета к грибковым и бактериальным заболеваниям сельскохозяйственных культур и снижает содержание радионуклидов в продуктах растениеводства [7]. Обработка растений амбиолом ускоряет темпы роста и повышает их продуктивность, что, по мнению авторов, может быть следствием увеличения количества цитокининов и ауксинов, а также усиления процесса фотофосфорилирования и интенсивности фотосинтеза [8]. Амбиол нашел применение в фармакологии.

Он повышает эффективность и снижает токсичность противоопухолевой химиотерапии [9]. Применение амбиола в дозе 17 мг/кг при хронической сердечной недостаточности приводит к увеличению сократимости миокарда [10], что, вероятно, свидетельствует о его адаптогенных свойствах.

Целью нашего исследования было изучение адаптогенных свойств амбиола. Поскольку митохондрии играют одну из ведущих ролей в ответе организма на стрессовые воздействия, то исследование протекторных свойств препарата проводили на митохондриях печени мышей.

Материалы и методы Работу проводили на митохондриях печени мышей линии Balb/c весом 20-25 г.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [11]. 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.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [12]. 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-HoribaYvonGmbH (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.

Исследование ЖК состава мембран митохондрий печени проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [13, 14]. МЭЖК экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали. Определение количественного состава МЭЖК проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-

ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм фирма «J&W Scientific», США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°С со скоростью 4°С/мин. Температура инжектора и детектора − 270°С; скорость газа-носителя гелия составляла 2,0 мл / мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [15].

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии.

Острая гипобарическая гипоксия Моделирование острой гипобарической гипоксии 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, (“Sigma Aldrich,” США); HEPES (“MP Biomedicals”, Германия), метанол, хлороформ, карбонат калия (Merck, Германия),), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия).

Результаты и обсуждение. Для исследования антистрессовых свойств препарата необходимо было разработать модель имитирующую стресс. Поскольку в условиях стресса в клетке увеличивается содержание АФК, основным источником которых являются митохондрии, то необходимо было найти условия, при которых будет увеличиваться продукция АФК митохондриями, а, следовательно, будет активироваться ПОЛ . Эту задачу мы решили, разработав модель «старения» (инкубация митохондрий печени мышей в гипотонической солевой среде при комнатной температуре. «Старение» митохондрий приводило к росту генерации АФК митохондриями, что отразилось в увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 1,7-2 раза. Введение в среду инкубации митохондрий амбиола приводило к доза зависимому снижению интенсивности флуоресценции. При этом наиболее эффективными концентрациями были 10^{-5}- 10^{-6} и 10^{-9} М [16]. Можно было предположить, что именно в этих концентрациях препарат будет проявлять антистрессовые свойства.

Наличие этих свойств у препарата проверяли на модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ). ОГГ вызывала увеличение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей в 2,8 раза. Введение животным амбиола (АМБ) в дозе 10^{-6} моль/кг, в течение 5 дней предотвращало активацию ПОЛ (рис. 1), что свидетельствовало о наличии у препарата протекторных свойств.

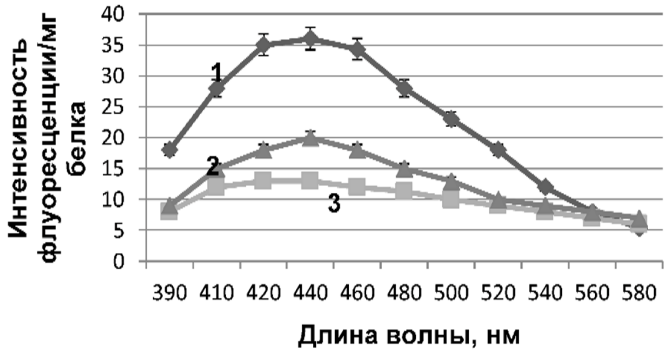


Рис. 1. Влияние острой гипобарической гипоксии (ОГГ) и амбиола (АМБ) на спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей.1-ОГГ; 2-ОГГ+10^{-6} амбиол; 3-контроль.

Активация перекисного окисления липидов, по-видимому, должна была повлиять на жирнокислотный состав общей липидной фракции митохондрий. Действительно, острая гипобарическая гипоксия вызывала изменения в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК). Так содержание 18:2ω6 снизилось на 13%, а содержание 18:1ω9 – на 14%. Отметим, что ОГГ приводила и к изменениям в содержании C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей.

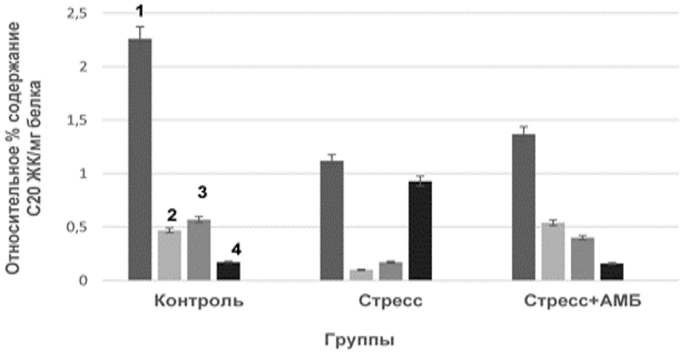


Рис. 2. Влияние ОГГ (стресс) и АМБ на относительное % содержание C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей. 1 – 20:3ω3; 2 – 20:2ω6; 3 – 20:1ω9; 4 – 20:0.

Содержание 20:4ω6 в мембранах митохондрий в условиях ОГГ почти не изменилось, пул 20:3ω3 снижался на 50,5% (рис 2, столбик 1), 20:2ω6 – на 80%% (рис. 2, столбик 2), а 20:1ω9 – на 70%% (рис. 2, столбик 3). Введение мышам амбиола предупреждало эти изменения.

Трансформация физико-химических свойств мембран митохондрий, возможно, влияла на функционирование этих органелл, что отразилось на физиологических показателях и, прежде всего, на выживаемости животных в условиях гипоксии. Продолжительность жизни животных в условиях различных видов гипоксии возрастала в 3,5-4,0 раза, а выживаемость увеличилась на 20-30% (таблица 1).

Табл. 1. Протекторная активность калий амбиола (Представлены результаты 10 опытов).

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	АМБ 10^{-6} моль/кг
Подъем на высоту 11,5 тыс. м (*гипобарическая гипоксия*)	Время жизни в минутах % выживших	4,0±1,2 20%	14,5± 2,0 40%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (*гемическая гипоксия*)	Время жизни в минутах % выживших	3,1±0,5 0%	11,3±1,1 28%
Инъекция азида натрия 20 мг/кг (*цитотоксическая гипоксия*)	Время жизни в минутах % выживших	5,1±0,9 20%	20,3±1,4 50%

Исходя из полученных данных можно предположить, что протекторная активность амбиола обусловлена его антиоксидантными свойствами. Препарат, предотвращая активацию ПОЛ, вероятно, предупреждал дисфункцию митохондрий в условиях стресса, и следовательно способствовал сохранению энергетического метаболизма на высоком уровне, что, вероятно, обеспечивало устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brishty ShR. Hossain MdJ, Khandaker MU, Faruque MRI, Osman H, Abdur Rahman SM. A Comprehensive Account on Recent Progress in Pharmacological Activities of Benzimidazole Derivatives. Front. Pharmacol., Sec. Experimental Pharmacology and Drug Discovery 2021;12: 762807. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.762807
2. Kumar R, Marianesan AB, Pathak Sh. Benzimidazole as a Privileged Scaffold in Drug Design and Discovery. Curr Top Med Chem. 2024; 24 (17):1504-1528. doi: 10.2174/0115680266314704240522112439

3. Наметкин, СС. Гетероциклические соединения. М.: Наука, 1981- 356 с.
4. Тюкавкина, Н А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков М.: Дрофа, 2005. – 294, 295
5. Verma R, Gupta Ch, Ganie AM, Kumar V, Singh S, Singh PK. Chemistry of benzimidazole and their derivatives: mini review. International Journal of Modern Pharmaceutical Research (IJMPR). 2021; 5(3): 167-197.
6. Мирсалимова СР, Жакбаров Д. Исследования синтеза и свойства производных бензимидазола. Universum: технические науки: электрон. научн. журн. 2022; 11(104). URL: https://7universum.com/ru/tech/archive/item/14490
7. Кирсанова ЕВ, Кириллова ИГ. Влияние препарата амбиол на продукционный процесс гороха и картофеля Вестник Орел ГАУ. 2007;4: 7-96
8. Евсюнина АС. Влияние эпибрассинолида и амбиола на гормональный баланс и ультраструктуру тканей растений картофеля при регуляции ростовых процессов в онтогенезе. Дис. канд. биологических наук (Институт биохимии им. А.Н. Баха, М., 2006 -116 с.
9. Куликов ОА. Влияние амбиола на терапевтическую эффективность и токсичность противоопухолевой химиотерапии в эксперименте : диссертация кандидата медицинских наук Мордовский государственный университет, Саранск, 2011.- 106 с
10. Павлов ДА, Замотаева МН, Конорев ВВ, Ерастова МВ, Горинова ЕС, Фоминова ИС. Функциональные изменения миокарда при экспериментальной сердечно-сосудистой патологии и на фоне применения соединений 5-гидроксибензимидазола и 3-гидроксипиридина. Сборник тезисов XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва, 2017 г
11. Mokhova EN, Skulachev VP, Zhigacheva IV. Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. BBA. 1977; 501: 415-423 doi: 10.1016/0005-2728(78)90109-3.
12. Fletcher BI, Dillard CD, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Anal. Biochem. 1973; 52: 1–9 doi: 10.1016/0003-2697(73)90327-8.
13. Carreau JP, Dubacq JP. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. J Chromatogr1979; 151 (3): 384 -390. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get ;
14. Wang J, Sunwoo H, Cherian G, Sim IS. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. Poult Sci.2000; 79 (8):1168-1171. DOI: 10.1093/ps/79.8.1168. .
15. Golovina RV, Kuzmenko TE. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on their retention indices. Chromatogr. 1977;10 (9): 545-548.
16. Жигачева ИВ, Крикунова НИ, Кузнецов ЮВ, Голощапов АН. Амбиол модулирует функциональные характеристики митохондрий проростков гороха. Биофизика 2024; 69(2): 231–236. https://doi.org/10.31857/S0006302924020073

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПО АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РЕДОКС ИНДИКАТОРОВ В ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Зорова Л.Д.[1,3], Каргапольцева А.С.[2], Семенович Д.С.[1,3], Фомин Е.О.[4], Пантелеева А.А.[1], Лямзаев К.Г.[1], Плотников Е.Ю.[1,3], Зоров Д.Б.[1,3]

[1]Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации, Москва, Россия
[4]Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Окислительно-восстановительный (редокс) баланс – фундаментальный регулятор клеточного метаболизма, сигналинга и выживания [1]. В норме редокс-гомеостаз поддерживается за счет динамического равновесия между генерацией активных форм кислорода (АФК) и активностью антиоксидантных систем.

Клеточный редокс-гомеостаз обеспечивается сложной сетью взаимосвязанных редокс-пар, среди которых доминирующую роль играют тиол-дисульфидные системы (глутатион, тиоредоксин, цистеиновые остатки белков), пиридиновые (NAD^+/NADH и $NADP^+$/NADPH) и флавиновые (FMN/$FMNH_2$ и FAD/$FADH_2$) нуклеотиды, а также металлы переходной валентности (Fe^{3+}/Fe^{2+} и Cu^{2+}/Cu^{+}).

Важнейшим свойством данной системы является наличие термодинамического сопряжения между отдельными редокс-парами, что позволяет рассматривать внутриклеточное редокс-пространство как единую гомеостатическую систему.

Проблема оценки редокс потенциала клеток имеет важное значение не только для фундаментальной биологии, но и для решения практических задач терапии. Прежде всего это применимо к патологиям, сопровождающимся окислительным стрессом, к которым относятся сердечно-сосудистые патологии, инсульты головного мозга, инфаркты миокарда и почек, вносящие основной вклад в структуру общей

смертности. Окислительный стресс возникает в ситуации превышения производства окислителей над их нейтрализацией и сопровождается интенсификацией генерации активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион, пероксид водорода, гидроксильный радикал и др., истощением антиоксидантных резервов и окислительной модификацией биомолекул (карбонилирование белков, перекисное окисление липидов, окисление нуклеотидов). В повышенной генерации АФК вне зависимости от этиологии окислительного стресса ключевая роль отводится митохондриям, в норме обеспечивающим оптимальный уровень АФК, необходимый для поддержания пролиферации, дифференцировки и гибели нефункциональных клеток.

Одной из важных медико-биологических проблем является поддержание нормального редокс потенциала по всему объему органа, хотя при нормальном кровоснабжении клетки, приближенные к кровеносным сосудам, находятся в более предпочтительных условиях по снабжению кислородом и дыхательными субстратами. Физиологическая регуляция и достаточно обширная и лабильная организация распространения кровеносных капилляров по ткани, которые могут переходить в открытое состояние в зависимости от метаболических запросов, вызванных перемежающимися состояниями покоя и активации, обычно являются достаточными для недопущения гипоксии в ткани. Однако, может возникать ситуация, при которой становится невозможным обеспечить равновесие между доставкой и потреблением кислорода, когда для адекватного протекания метаболических процессов требуется более высокий уровень кислорода по сравнению с тем, что доставляется кровеносной системой, и в удаленных от кровеносной системы отделах ткани возникают гипоксические участки, которые резко начинают ограничивать потребление кислорода. Что касается отдельных клеток, то для клеток малого размера диффузии кислорода из внеклеточной среды обычно бывает достаточно для более или менее равномерной его доставки во все клеточные отделы. Однако для больших клеток, к которым можно отнести кардиомиоциты, клетки поперечно-полосатой скелетной мускулатуры и яйцеклетки, в зависимости от скорости метаболизма в их центральных отделах могут возникать гипоксические участки.

С точки зрения биоэнергетики, гипоксия – это состояние в толще клетки или ткани, при котором локальное содержание кислорода меньше афинности митохондриальной цитохромоксидазы. При этом скорость дыхания начинает лимитироваться концентрацией доступного кислорода, приводя к ступенчатому восстановлению компонентов дыхательной цепи переноса электронов. В нормоксии цитохромоксидаза не является

лимитирующей в электрон-транспортной цепи, и стационарный уровень ее восстановленности, измеренный спектрофотометрически, почти не детектируется, при этом определяются другие компоненты (цитохромы, флавиновые и пиридиновые нуклеотиды). Гипоксия прежде всего приводит к появлению восстановленной формы цитохромоксидазы. За этим этапом происходит восстановление всех компонентов дыхательной цепи митохондрий, включая пиридиновые нуклеотиды.

Это свойство было использовано в лаборатории Бриттона Чанса, когда в отдельном органе удалось зарегистрировать гипоксические участки за счет вызванного ишемическим воздействием усилением аутофлуоресценции восстановленной формы NAD^+ при возбуждении ее светом длины волны около 340 нм [2]. Аналогичные ответы можно получить, изучая вызванные гипоксическим воздействием изменения аутофлуоресценцим флавиновых коферментов (возбуждение около 488 нм) [3-7].

Без сомнения, уровень восстановленности компонентов дыхательной цепи будет зависеть как от доставки, так и от утилизации кислорода, то есть от дыхательной (метаболической) активности клетки. В частности, на практическом уровне востановленность пиридиновых нуклеотидов будет в значительной степени отражать индивидуальную дыхательную активность конкретной клетки. Таким образом, аутофлоуресценция NADH в отдельных клетках будет характеризовать скорость дыхания каждой клетки в культуре.

При этом надо отдавать отчет, что почти весь пул пиридиновых нуклеотидов сосредоточен в митохондриях [6,7], что позволяет в клеточной культуре визуализировать все митохондрии при использовании флуоресцентного микроскопа в разных технических исполнениях. При этом возможно проведение анализа интенсивности флуоресценции NADH в каждом филаменте митохондриального ретикулума клетки, причем визуализация митохондрий произойдет без использования митохондриальных красителей. На рис 1 дан пример конфокального изображения строения и организации митохондриального ретикулума в клетках HeLa, где на основании интенсивности флуоресценции NADH можно говорить об интенсивности дыхания в отдельных клетках в культуре.

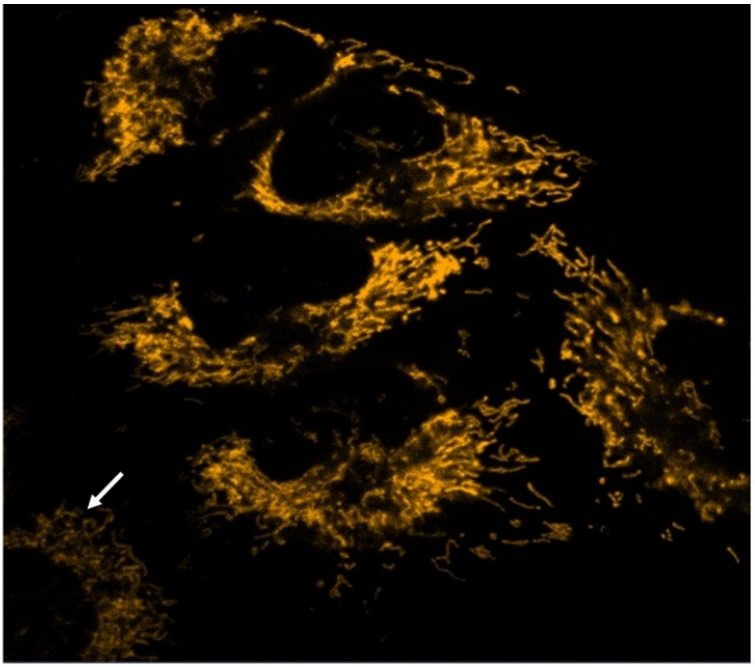


Рис. 1. Аутофлуоресценция NADH в клетках HeLa. Видна вся организация митохондриального ретикулума с разной интенсивностью флуоресценции (степени восстановленности) NADH. Стрелкой показана клетка, в которой уровень NADH снижен, что свидетельствует о более окисленном состоянии и может говорить о том, что интенсивность дыхания в этой клетке выше, чем в других.

Мы предполагаем, что с некоторыми ограничениями можно проводить оценку скорости митохондриального дыхания отдельных клеток в каждой отдельно взятой клетке в культуре с использованием аутофлуоресценции пиридиновых и флавиновых нуклеотидов, считая, что активация дыхания сопровождается окислением указанных эндогенных редокс индикаторов, а угнетение дыхания, наоборот, вызывает восстановление компонентов дыхательной цепи и их сопряженных партнеров, тем самых приводя к восстановлению редокс индикаторов. Кроме этого, без использования химических агентов, которые неминуемо вызывают нежелательные изменения в клетке и митохондриях, используя аутофлуоресценцию эндогенных редокс индикаторов, можно визуализировать митохондрии в клеточной культуре и оценить состояние митохондриального ретикулума.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-24-00183.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sies H, Mailloux RJ, Jakob U Fundamentals of redox regulation in biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024; 25(9): 701-719.
2. Barlow CH, Chance B. Ischemic areas in perfused rat hearts: measurement by NADH fluorescence photography. *Science.* 1976; 193(4256):909-10.
3. A.V. Kuznetsov, O. Mayboroda, D. Kunz, K. Winkler, W. Schubert, W.S. Kunz, J. Functional imaging of mitochondria in saponin-permeabilized mice muscle fibers. *Cell Biol*. 1998; 140(5): 1091-1099.
4. I. Hassinen, B. Chance. Oxidation-reduction properties of the mitochondrial flavoprotein chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1968; 31: 895-900.
5. Kunz WS. Control of oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504(1):12-9.
6. Chance, B., Williamson, J. R., Famieson, D., and Schoener, B. Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart, *Biochem. Z.* 1965; 341: 357-377.
7. Eng, J., Lynch, R. M., and Balaban, R. S. NADH fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes, *Biophys. J.* 1989; 55(4): 621-630.

СТРАТЕГИЯ РАЗВИТИЯ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И БОРЬБЫ С ОПУХОЛЯМИ НА ОСНОВАНИИ ЗНАНИЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЭУКАРИОТОВ, ОБИТАЮЩИХ В ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Зоров Д.Б.[1,2], Зорова Л.Д.[1,2], Бабенко В.А.[1,2], Семенович Д.С.[1,2], Певзнер И.Б.[1,2], Иванова А.Е.[2], Зоров С.Д.[1], Силачев Д.Н.[1,2], Плотников Е.Ю.[1,2], Сухих Г.Т.[2]

[1]Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации, Москва, Россия

С точки зрения биоэнергетики при эволюционном возникновении аэробного характера производства энергии выигрыш по сравнению с анаэробным путем был значительным, позволяющим усилить базальный метаболизм с возможностями резкой его мобилизации, определяемой внезапно возникающим обстоятельствами, в результате этого повышая вероятность выживания живой системы и ее большую приспособленность к окружающей среде. Однако этот энергетический бонус неминуемо сопровождался нежелательной генерацией окислительных факторов, требующих постоянной подстройки и сохранения их гомеостаза. Природа нашла применение этим факторам, используя их для регуляции целого ряда насущных процессов (пролиферация, дифференцировка или программируемая гибель) вплоть до направленного уничтожения чужеродных патогенов [1, 2]. Это потребовало тонкой регуляции уровня этих окислителей, которые в зависимости от потребностей, могли либо резко возрастать, любо падать до такого уровня, при котором регуляция становилась невозможной, при этом индуцируя патологию окислительного или восстановительного толка, что в равной мере является пагубной для живой системы.

Самым простым подходом к регуляции уровня окислителей является создание системы, которая утилизирует основной источник активных форм кислорода (АФК), а именно молекулярный кислород. В этом контексте для природы знаменательным было возникновение митохондрий, которые появились на Земле около 1 млрд лет назад. В последних терминальным акцептором в цепи переноса электронов является цитохромоксидаза, которая утилизирует кислород до значений, около 10^{-6} М, тем самым резко уменьшая вероятность генерации АФК [3].

Реакция образования АФК является реакцией первого порядка по кислороду, что по идее должно приводить к тому, что при понижении содержания окружающего кислорода вдвое также вдвое должна быть уменьшена генерация АФК. Однако, на эту закономерность накладывается нелинейная генерация АФК в зависимости от величины мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий [4], в результате чего генерация АФК в митохондриях зависит не только от концентрации окружающего кислорода, но и от метаболической активности.

В этом плане показательным является рассмотрение действия так называемых «мягких» разобщителей, которые доказали свою эффективность в теоретически обоснованной и практической борьбе с патологиями разного толка. По общим представлениям их положительное действие сводится к способности уменьшать генерацию АФК из-за нелинейной зависимости этой генерации от мембранного потенциала [4].

Гипоксия являет собой одно из патогенных свойств, характерных для патологий, чаще всего вызываемых окклюзией или разрывом кровеносных сосудов, в результате чего прекращается доступ кислорода и питательных субстратов в ткань. В практических медицинских терминах это явление называется ишемией, которая особенно остро ощущается для высоко метаболизирующих тканей, таких как мозг, сердце и почки, и носит крайне негативный характер, часто заканчивающийся фатально. Это накладывает на медико-биологическую науку требования разработать подходы для предотвращения ишемического воздействия и минимизации негативных последствий.

Митохондриальная биоэнергетика является окислительной, направленной на генерацию энергии в виде ATP за счет окисления восстановленных эквивалентов с образованием воды как конечного продукта окисления. В условиях гипоксии эти условия являются невыполнимыми, и митохондриальная энергетика должна была бы отсутствовать. Однако даже в тех живых эукариотических системах, для которых нормальная среда обитания содержит кислород на уровне, недоступном для цитохромоксидазы, митохондрии все же присутствуют. Оказывается, что даже в хронических условиях недоступности кислорода митохондрии могут использовать цепь переноса электронов в ее начальную часть, а именно Комплекс I (рис 1).

Характерными представителями многоклеточных эукариотических существ, обитающих в гипоксической среде, являются нематоды, в частности, имаго аскариды (Ascaris suum) и Caenorhabditis elegans [5]. Механизм генерации ATP в основных чертах определяется обращением классической парциальной реакции цикла Кребса, сукцинат дегидрогеназы и использовании фумарат редуктазы для окисления NADH. На рис 1 представлена организация митохондриальной энергетики в ее нормоксическом и гипоксическом исполнении. Для обеспечения

энергетики в условиях гипоксии указанные выше организмы приобрели адаптивные пути, включающие в себя некоторые элементы нормоксического пути, суть которых сводится к использованию комплекса II (путем активации фумарат редуктазной реакции) и ее утилизации за счет приобретенного низкопотенциального хинона, родохинона. Восстановление родохинона позволяет системе не только освободиться от восстановительных эквивалентов в виде NADH, высокий уровень которых явно «вреден» для жизнеспособности клетки, но и обеспечить протекание фумарат редуктазной вместо сукцинат дегидрогеназной реакции за счет замены высокопотенциального хинона (убихинона) на низкопотенциальный хинон CoQ10). Редокс потенциал пары убинон/убихинол составляет +110 мв, и он не позволяет обеспечить превращение фумарата в сукцинат, редокс потенциал пары которой составляет +30 мв, в то время как пара родохинон/родохинол с редокс потенциалом -63 мв это с легкостью делает. Отметим, что и другой хинон, менахинон с редокс потенциалом -60 мв также может обеспечить протекание фумарат редуктазной реакции [6,7].

Из этого анализа следует вывод: если необходимо заставить митохондриальную систему производить хотя бы небольшую энергию в анаэробных условиях, имитируя энергетику анаэробных эукариотов, надо обеспечить синтез/поступление в эту систему низкопотенциальных хинонов.

Однако, одного поступления хинонов может быть недостаточно, ибо в результате работы фумарат редуктазной реакции образуется сукцинат, избыток которого для клетки нежелателен. Считается, что накопление сукцината (в частности, отмечаемое при ишемической атаке) может быть патогенным по целому ряду причин, из которых выделяют опосредованные сукцинатным рецептором в клетке патологические изменения и особенно это может проявиться в онкогенезе, в значительной степени способствуя метастазированию [8-10]. Возросший уровень сукцината в некоторых опухолевых клетках может быть вызван гипоксией вследствие того, что ангиогенез не успевает за скоростью роста опухоли. В дополнение, сукцинат может возрастать за счет характерных мутаций в сукцинат дегидрогеназе или за счет вызванной гипоксией стимуляции формирования фенотипа М2 макрофагов, находящихся в микроокружении опухоли, в результате поддерживая рост и прогрессирование опухоли [11].

В норме концентрация сукцината в клетке находится в пределах от десятков до сотен микромолей. В таком окружении митохондрии практически не производят АФК, однако это производство резко возрастает при использовании миллимолярных уровней сукцината как субстрата дыхания изолированных митохондрий *in vitro*, что соответствует уровням сукцината в клетке в условиях патологий [12].

Во избежание нежелательных последствий ишемии/реоксигенации, надо либо вывести сукцинат из клетки и/или не допустить возможность протекания процесса обратного транспорта электронов по дыхательной цепи. Вполне вероятно, что именно накопление сукцината в клетке с последующим его окислением может приводить к резкому увеличению вероятности транспорта электронов от сукцината через комплекс II, а затем и через комплекс I [13,14], что сопровождается усиленной генерацией АФК. Возможно, что именно этим процессом обратного транспорта электронов по дыхательной цепи определяется взрыв генерации АФК в условиях гипоксии/реоксигенации (ишемии/реперфузии) [15]. Во избежание этого избыточного производства АФК, надо снабдить митохондриальную систему ингибитором комплекса I, желательно лишь на время, пока не произойдет снижение уровня сукцината до нормы. Альтернативой или дополнением может быть снабжение системы антиоксидантами, которые устранят избыточные АФК.

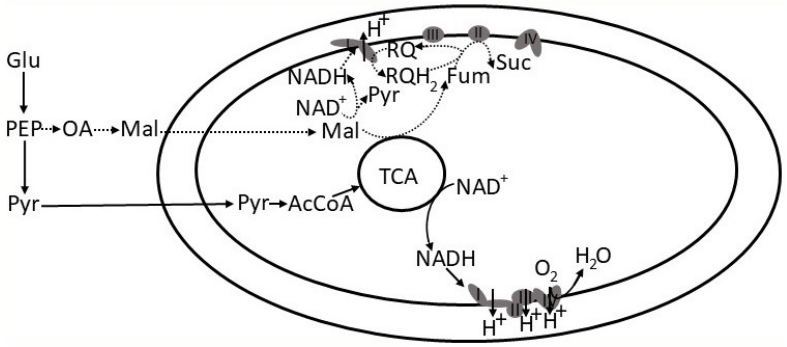


Рис. 1. Изменение метаболизма митохондриальной энергетики в условиях гипоксии. Сплошными стрелками показаны пути, характерные для аэробного метаболизма, пунктирными – для анаэробного метаболизма. PEP – фосфоэнолпируват, Pyr – пируват, OA – оксалоацетат, Mal – малат, RQ – родохинон, Suc – сукцинат, Fum – фумарат, TCA – цикл трикарбоновых кислот, I, II, III, IV – дыхательные комплексы I-IV.

Вся эта аргументация позволяет очертить основные линии исследований по разработке стратегии развития антиишемической защиты путем разумного копирования элементов клеточной сигнализации, которую в результате эволюции приобрели эукариотические организмы, обитающие в гипоксических условиях.

Однако, понимание того, как устроена эта защита в этих организмах и каким образом ее можно копировать, может позволить применить

обратную логику для разработки стратегии уничтожения этой адаптивной системы, которую приобрели нежелательные для организма-хозяина паразитические организмы и клетки. Действительно, такая логика получила развитие для уничтожения паразитических организмов, в частности гельминтов, обитающих в гипоксических условиях кишечника, а именно за счет использования разного рода ингибиторов фумарат редуктазы [16-18]. Эта идея совсем не новая, и она получила свою реализацию, хотя указанные выше ограничения, вызванные нежелательными сопряженными процессами, указывают лишь на общее направление возможности, но детали требуют не просто использования монофункционального реагента, а предусматривают использование дополнительных элементов (агентов), которые устраняют действие побочных эффектов.

Прежде всего это имеет отношение к возможности использования обратной логики антиишемической стратегии для уничтожения раковых клеток солидных опухолей, испытывающих дефицит по кислороду. В недавней работе мы разобрали некоторые редко рассматриваемые потенциальные митохондриальные мишени, которые в принципе могли бы быть эффективными в борьбе с некоторыми злокачественными и незлокачественными опухолями [19]. Учитывая детали изменения метаболитов, возникающие при ингибировании фумарат редуктазы, надо опять же отметить, что использование лишь ингибиторов этого фермента будет явно недостаточно, хотя бы понимая роль сукцината и возрастающего уровня АФК, способствующих усилению пролиферативных свойств системы, которые не всегда желательны. Поэтому наша работа ставит целью показать минимальное число мишеней, которые надо учитывать, как при разработке антиишемических средств, так и средств для уничтожения нежелательных клеточных систем.

Поддержано государственным заданием министерства здравоохранения РФ № 124013000594-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zorov DB, Bannikova SY, Belousov VV, Vyssokikh MY, Zorova LD, Isaev NK, Krasnikov BF, Plotnikov EY. Reactive oxygen and nitrogen species: friends or foes? Biochemistry (Mosc). 2005 Feb;70(2):215-21. doi: 10.1007/s10541-005-0103-6.
2. Zorov DB, Isaev NK, Plotnikov EY, Zorova LD, Stelmashook EV, Vasileva AK, Arkhangelskaya AA, Khrjapenkova TG. The mitochondrion as Janus bifrons. Biochemistry (Mosc). 2007 Oct; 72(10):1115-26. doi: 10.1134/s0006297907100094.
3. Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. J Biol Chem. 1997 Jul 25; 272(30):18808-16. doi: 10.1074/jbc.272.30.18808.

4. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett. 1997 Oct 13;416(1):15-8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01159-9.
5. Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CP, Roos MH, Tielens AG. Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. J Biol Chem. 1995 Dec 29; 270(52): 31065-70. doi: 10.1074/jbc.270.52.31065.
6. Kita K, Hirawake H, Miyadera H, Amino H, Takeo S. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from Ascaris suum and Plasmodium falciparum. Biochim Biophys Acta. 2002 Jan 17; 1553(1-2):123-39. doi: 10.1016/s0005-2728(01)00237-7.
7. Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, Harada S, Kita K. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2012 May; 1820(5): 643-51. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.013. Epub 2011 Dec 29.
8. Wu, K.K. Extracellular Succinate: A Physiological Messenger and a Pathological Trigger. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24: 11165.
9. Selak, M.A.; Armour, S.M.; MacKenzie, E.D.; Boulahbel, H.; Watson, D.G.; Mansfield, K.D.; Pan, Y.; Simon, M.C.; Thompson, C.B.; Gottlieb, E. Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF-Alpha Prolyl Hydroxylase. Cancer Cell. 2005; 7: 77–85
10. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The Tumor Microenvironment. Curr. Biol. 2020; 30: R921–R925.
11. Weiss, J.M.; Davies, L.C.; Karwan, M.; Ileva, L.; Ozaki, M.K.; Cheng, R.Y.S.; Ridnour, L.A.; Annunziata, C.M.; Wink, D.A.; McVicar, D.W. Itaconic Acid Mediates Crosstalk between Macrophage Metabolism and Peritoneal Tumors. J. Clin. Investig. 2018; 128: 3794–3805.
12. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. J Bioenerg Biomembr. 1997 Feb; 29(1): 89-95. doi: 10.1023/a:1022420007908
13. Klingenberg M, Slenczka W. Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships. Biochem Z. 1959; 331: 486-517.
14. Ernster L. Lee CP. Energy-linked reduction of NAD+ by succinate. Methods Enzymol. 1967; 10: 729-738
15. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ.Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev. 2014; 94(3): 909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013
16. Gibson TE. The value of pharmacological studies in the development of new antinematodal drugs. J Parasitol. 1971 Aug; 57(4):100-3.
17. Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. Ann N Y Acad Sci. 2010 Jul; 1201: 44-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05620.x.
18. Kita K, Takamiya S. Electron-transfer complexes in Ascaris mitochondria. Adv Parasitol. 2002; 51: 95-131. doi: 10.1016/s0065-308x(02)51004-6.
19. Zorova LD, Abramicheva PA, Andrianova NV, Babenko VA, Zorov SD, Pevzner IB, Popkov VA, Semenovich DS, Yakupova EI, Silachev DN, Plotnikov EY, Sukhikh GT, Zorov DB. Targeting Mitochondria for Cancer Treatment. Pharmaceutics. 2024 Mar 23; 16(4):444. doi: 10.3390/pharmaceutics16040444.

ОСТРАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ ПЕЧЕНИ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ, СВЯЗАННОЙ С КОМПЛЕКСОМ I, НО НЕ С КОМПЛЕКСОМ II – ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ СУКЦИНАТА

Икромова Ф.Р.[1], Стопницкий А.А.[2], Баев А.Ю.[1,3]

[1]Центр передовых технологий, Ташкент, Узбекистан
[2]Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи, Ташкент, Узбекистан
[3]Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

Введение. Печень играет ключевую роль в обезвреживании вредных веществ, присутствующих в организме. Риск токсического поражения печени остаётся актуальной проблемой для современной биологии и медицины в связи с воздействием экологических токсинов, пестицидов, химиотерапии, употреблением алкоголя и других факторов. Высокая концентрация токсических веществ различной природы вызывает выраженный оксидативный стресс, воспаление, ухудшение биоэнергетических процессов, что приводит к гибели клеток печени и нарушению функционирования органа [1, 2]. Основной терапевтический подход лечения пациентов с токсическим гепатитом заключается в устранении действия токсического агента в сочетании с направленным купированием патологических процессов, вызванных его воздействием. Этот комплексный подход включает снижение оксидативного стресса, подавление воспалительных процессов, выведение аммиака и поддержание клеточной биоэнергетики.

Существует множество исследований, демонстрирующих, что интоксикация печени приводит к нарушению митохондриальной биоэнергетики, вследствие чего митохондрии рассматриваются в качестве одного из ключевых фармакологических мишеней при лечении токсического гепатита. В частности, было показано, что острая интоксикация CCl_4 вызывает значительное снижение потребления кислорода митохондриями и активности ферментов дыхательной цепи [3, 4]. Однако во многих исследованиях сообщается, что митохондриальная дисфункция наблюдалась в присутствии субстратов для Комплекса I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), но не в присутствии сукцината — субстрата сукцинатдегидрогеназы (Комплекс II ЭТЦ). Более того, было также показано, что при интоксикации CCl_4 наблюдается сниженная активность малат-аспартатного шатла в митохондриях печени.

Снижение активности дыхания, зависимого от Комплекса I, было также отмечено при хроническом употреблении алкоголя, а также в клеточных моделях печёночной недостаточности, вызванной передозировкой парацетамолом [5, 6]. Комплекс I ЭТЦ особенно чувствителен к различным видам стресса, и снижение его активности наблюдалось при ряде патологий, включая гипоксию, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, синдром Лея, кардиомиопатию, черепно-мозговую травму, нейровоспаление, метастазы рака почки и другие [6, 8-10].

Учитывая, что токсическое поражение печени сопровождается снижением активности Комплекса I и нарушением работы малат-аспартатного шатла, мы предположили, что метаболическая поддержка с использованием сукцината может способствовать восстановлению митохондриальной биоэнергетики при токсическом гепатите.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на белых беспородных самцах крыс массой 200–250 г. Модель острого токсического гепатита создавали однократным внутрибрюшинным введением 50% раствора CCl_4 в стерильном оливковом масле (1:1) из расчёта 200 мг/100 г массы тела. Метаболическую добавку вводили дважды в сутки по 0.4 мл/100 г массы тела в течение трёх дней после введения CCl_4.

Животные были разделены на три группы:

– контроль (n=8),

– патология (CCl_4, n=10),

– лечение (CCl_4 + терапия, n=10).

Митохондрии изолировали из печени методом дифференциального центрифугирования. Оценку дыхания проводили на полярографической системе Mitocell S200. Показатели выражались в процентах от V2 в глутамат-малатной среде контрольной группы.

Использовались 3 вида инкубационных сред:

– глутамат-малат: 5 мМ глутамат, 1 мМ малат;

– сукцинат: 5 мМ сукцинат;

– сукцинат + ротенон: 5 мМ сукцинат + 1 мкМ ротенон;

Все среды содержали: 120 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ KH_2PO_4, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA (для CRC EGTA исключали). Концентрация белка — 0.5 мг/мл, объём — 3 мл.

Оценка митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi$м) проводилась с использованием родамина 123. Митохондрии инкубировали на льду в темноте в течение 30 минут. Измерения проводили при длине волны возбуждения 505 нм и эмиссии 534 нм. Оценка редокс-состояния NAD(P)H и FAD^+ проводилась по автофлуоресценции

(NAD(P)H – возбуждение 360 нм, эмиссия 455 нм; FAD^+ – возбуждение 454 нм, эмиссия 533 нм). Использовали СССР для стимуляции окисления и антимицин А для накопления восстановленной формы. Оценка кальциевой буферной ёмкости митохондрий (CRC) проводилась с красителем Calcium Green 5N , при возбуждении 506 нм и эмиссии 532 нм. Каждые 30 секунд в пробу добавляли по $CaCl_2$ до резкого повышения флуоресценции — признака открытия поры PTP. Измерения проводились на спектрофлуориметре Cary Eclipse. Оценка уровня МДА (маркер ПОЛ) проводилась после замораживания/оттаивания образцов, инкубации с $FeSO_4$ и аскорбиновой кислотой, обработки ТХУК и нагревания с ТБК (95 °C, 30 мин). Спектры регистрировали при 532 нм Cary 60 UV–Vis, Agilent.

Гистологический анализ проводили на образцах печени, фиксированных в 10% формалине и окрашенных гематоксилин-эозином. Морфометрический анализ выполняли по 5 полям зрения на 5-й и 9-й дни, оценивали дистрофические, некротические и двуядерные клетки. Биохимический анализ крови: образцы брали из хвостовой вены и определяли уровни АЛТ, АСТ, общего билирубина и глюкозы (наборы Human Diagnostics, Германия), а также свободного аммиака (BioSystems Diagnostics, Испания).

Результаты. В настоящем исследовании была оценена стратегия запуска биоэнергетики через сукцинатдегидрогеназу с целью улучшения митохондриальной биоэнергетики при остром токсическом поражении печени. В нашей работе было показано, что острая интоксикация, вызванная CCl_4, отрицательно влияет на митохондриальное дыхание, связанное с Комплексом I (в присутствии глутамата и малата в качестве энергетических субстратов), генерацию митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), пул митохондриального NAD(P)H и редокс-индекс NADH, кальциевую буферную ёмкость митохондрий (CRC), а также на структуру и функции печени. Запуск митохондриальной биоэнергетики через Комплекс II, используя сукцината в качестве метаболического субстрата *in vitro* значительно улучшало митохондриальное дыхание и генерацию $\Delta\Psi_m$, однако не оказывало выраженного влияния на CRC. Совместное применение ротенона с сукцинатом для предотвращения возможного обратного электронного транспорта не продемонстрировало значительных отличий по сравнению с эффектами одного сукцината. Лечение животных с острой печёночной недостаточностью метаболическим препаратом, содержащим сукцинат, инозин, метионин и никотинамид, приводило к улучшению дыхания и генерации $\Delta\Psi_m$, увеличению пула митохондриального NAD(P)H и редокс-индекса NADH,

повышению CRC, а также к снижению уровня оксидативного стресса. Эти изменения способствовали предотвращению деструктивных и дистрофических изменений в тканях печени крыс, вызванных интоксикацией CCl_4, одновременно способствуя восстановлению печёночной функции.

Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать метаболические добавки, направленные на запуск биоэнергетики через Комплекс II ЭТЦ, в качестве перспективного вспомогательного терапевтического подхода при остром токсическом поражении печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malaguarnera, G., et al., *Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents.* World journal of gastroenterology: WJG, 2012. **18**(22): p. 2756.
2. Angelova, P.R., et al., *Hyperammonaemia induces mitochondrial dysfunction and neuronal cell death.* JHEP Reports, 2022. **4**(8): p. 100510.
3. Cheshchevik, V., et al., *Rat liver mitochondrial damage under acute or chronic carbon tetrachloride-induced intoxication: protection by melatonin and cranberry flavonoids.* Toxicology and applied pharmacology, 2012. **261**(3): p. 271-279.
4. Hernández-Muñoz, R., M. Díaz-Muñoz, and V.C. de Sánchez, *Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis.* Archives of biochemistry and biophysics, 1992. **294**(1): p. 160-167.
5. Cederbaum, A.I., C.S. Lieber, and E. Rubin, *Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions damage to coupling site I.* Archives of biochemistry and biophysics, 1974. **165**(2): p. 560-569.
6. Piel, S., et al., *Cell-permeable succinate prodrugs rescue mitochondrial respiration in cellular models of acute acetaminophen overdose.* PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0231173.
7. Krähenbühl, S., J. Stucki, and J. Reichen, *Mitochondrial function in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat: qualitative and quantitative defects.* Biochemical pharmacology, 1989. **38**(10): p. 1583-1588.
8. Bakare, A.B., R.R. Rao, and S. Iyer, *Cell-permeable succinate increases mitochondrial membrane potential and glycolysis in leigh syndrome patient fibroblasts.* Cells, 2021. **10**(9): p. 2255.
9. Giorgi-Coll, S., et al., *Succinate supplementation improves metabolic performance of mixed glial cell cultures with mitochondrial dysfunction.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1003.
10. Vinokurov, A.Y., et al., *Energy substrate supplementation increases ATP levels and is protective to PD neurons.* Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, 2024. **6**: p. 100187.

СНИЖЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ СУСЛИКОВ (*UROCITELLUS UNDULATUS*) В ПРОЦЕССЕ ВХОДА В СОСТОЯНИЕ ГИБЕРНАЦИИ

Комелина Н.П., Амерханов З.Г.

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Особенностью зимоспящих животных является их способность значительно снижать уровень окислительного метаболизма, длительное время пребывать в этом состоянии и быстро выходить из него, значительно усиливая окислительные процессы в органах и тканях, используя пока неясные до конца механизмы [1,2]. Поскольку интенсивность окислительного метаболизма определяется характером окислительных процессов в митохондриях, изучение регуляции работы именно этих клеточных органелл позволит прояснить механизм угнетения дыхания животных при зимней спячке.

Еще в 60-е годы был обнаружен эффект подавления реакций окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из тканей гибернирующих животных, наиболее ярко выраженный в митохондриях печени [2]. Вопрос о его биофизических и молекулярных механизмах до сих пор полностью не раскрыт. В нашей лаборатории ранее было показано, что основной причиной подавления окислительной активности митохондрий печени гибернирующих сусликов является ингибирование дыхательной цепи в области bc1–комплекса [3]. Это ингибирование является обратимым, быстро снимается в процессе индуцированного выхода животных из состояния гибернации. Окислительная активность митохондрий печени, выделенных из просыпающихся животных, достигает своего максимума еще при температуре тела 25-27°C [4,5].

Динамика развития ингибирования в процессе входа животных в состояние гибернации мало исследована. Предположение о том, что развитие ингибирования опережает изменения температуры, укладывалось бы в представление большинства авторов о терморегуляторном значении этого явления [6,7]. В другом случае, если эти изменения значительно запаздывают и возникают уже в состоянии глубокой спячки, больше соответствует представлению о тканеспецифичности подавления субстратного окисления в печени гибернирующих животных.

Материалы и методы. Животные. В экспериментах использовались длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus*. Животных отлавливали в Якутии в летний период и содержали в специально

приспособленных помещениях с температурой 1-5°C. Период гибернации длится с октября по март, состоит из периодически повторяющихся баутов спячки (2-3 недели), когда животное находится в состоянии глубокого торпора (температура тела +3-4°C) и активных межбаутных состояний (1-2 дня) (температура тела +37°C). Для непрерывной регистрации состояния животных в подстилку гнездовых камер были вмонтированы термодатчики. Температура подстилки гнезд у гибернирующих животных была порядка 3-4°C, а при выходе из спячки поднималась до 12-16°C.

Изменения температуры в подстилке гнездовых камер коррелируют с собственной температурой тела в период входа животных в состояние гибернации [8]. Имеющиеся в нашем распоряжении данные по телеметрическому измерению температуры тела сусликов в аналогичных условиях в период входа в состояние гибернации позволили по температуре в подстилке гнездовых камер довольно точно судить о реальной температуре тела животных и подготовить 2 группы животных, входящих в состояние гибернации, с температурой тела 10-15°C и 20-25°C.

Спящих и входящих в состояния гибернации животных забивали путем декапитации, стараясь не подвергать их длительному стрессу. Активных животных перед декапитацией наркотизировали. В процессе забора тканей контролировали точную температуру тела в области сердца и ректально.

Измерение параметров дыхания митохондрий. Митохондрии печени выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования в абсолютно аналогичных условиях, как в случае с активными и гибернирующими сусликами. Среда выделения содержала: 250 мМ сахарозы, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES, pH 7.2. Скорость потребления кислорода суспензией митохондрий измеряли полярографическим методом, с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при постоянном перемешивании и температуре 26°C. Среда инкубации всегда содержала 1.5 мг/мл митохондриального белка, 250 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES, 3 мМ KH_2PO_4, 3 мМ $MgCl_2$.

В качестве субстрата дыхания использовали 4 мМ сукцината в присутствии 3 мкМ ротенона (для исключения вклада эндогенных НАДН-зависимых субстратов). Начальную скорость дыхания (V2) измеряли в присутствии субстрата. Фосфорилирующую скорость дыхания (V3) оценивали после добавки 100 мкМ АДФ. После того, как весь добавленный АДФ исчерпывается, оценивали скорость дыхания, определяемую величиной протонных утечек (V4). Максимальную скорость работы дыхательной цепи митохондрий (Vмакс) оценивали по полностью разобщенному дыханию в присутствии 0.5 мкМ FCCP.

Коэффициент дыхательного контроля (ДК) оценивали как отношение скорости дыхания при максимальном синтезе АТФ к скорости дыхания в отсутствие синтеза АТФ. Скорость разобщенного дыхания митохондрий непосредственно через комплекс 4 дыхательной цепи измеряли в присутствии искусственного субстрата дыхания тетраметил-п-фенилендиамин, ТМФД (400 мкМ) в присутствии 4 мМ аскорбата и 0.5 мкМ FCCP.

Результаты и обсуждение. Значительное подавление окислительной активности митохондрий печени начинает наблюдаться в группе животных достигших температуры 10-15°С (табл. 1). У этой группы, так же, как и у сусликов, гибернирующих длительное время (3-4°С), наиболее значительное подавление окислительной активности митохондрий наблюдается в фосфорилирующем (V4) (в 4 раза) и разобщенном (Vмакс) состояниях (в 3 раза). Степень ингибирования дыхания при этом уже практически достигает величины характерной для гибернирующих животных. В тоже время в группе животных, находящихся в начальной стадии вхождения в зимнюю спячку, с температурой тела 20-25°С, наблюдается снижение фосфорилирующего дыхания в 2.5 раза, дыхательного коэффициента в 2 раза и незначительного снижения максимальной скорости дыхания.

Табл. 1. Скорость дыхания митохондрий печени гибернирующих, входящих и активных сусликов в различных метаболических состояниях в присутствии сукцината. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Группы животных	V2	V3	V4	ДК	Vмакс
Активные (37°С) (n=7)	17.2±1.8	128.4±6.3	33.1±3.6	3.8±0.2	138.5±5.1
Входящие (20-25°С) (n=5)	24.4±2.2	52.3±3.2*	28.0±1.3	1.9±0.1*	122.3±4.8*
Входящие (10-15°С) (n=5)	12.1±2.1	31.4±3.1**	26.2±4.3	1.2±0.1**	43.3±5.7**
Гибернирующие (2-4°С) (n=7)	13.8±1.2	43.1±1.8**	35.9±2.6	1.2±0.1**	39.9±3.1**

* – достоверно по сравнению с активными животными $p < 0.05$, ** – достоверно по сравнению с активными животными $p < 0.01$.

Ранее было показано, что основной причиной подавления окислительной активности митохондрий печени гибернирующих сусликов является ингибирование дыхательной цепи, что ярче всего выражается в подавлении максимальной скорости дыхания в присутствии разобщителя [3]. На рис. 1 представлены максимальные скорости дыхания

суспензий митохондрий печени, наглядно демонстрирующие динамику изменения окислительной активности митохондрий печени в процессе вхождения в зимнюю спячку.

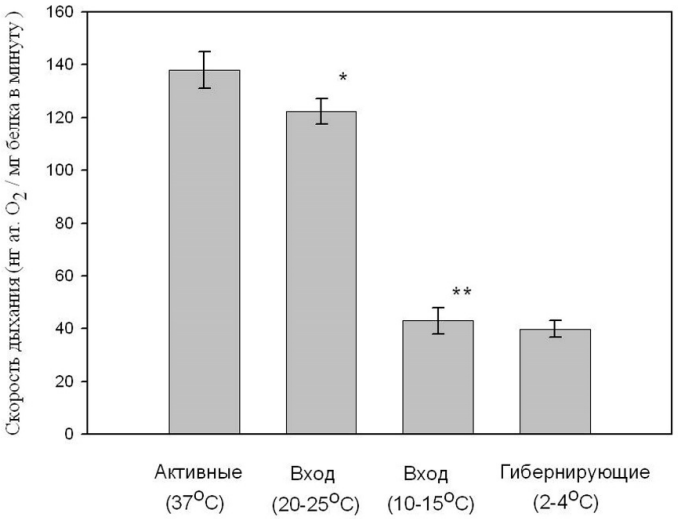


Рис. 1. Максимальная скорость дыхания препаратов митохондрий печени сусликов в процессе входа в гибернацию. * – достоверно по сравнению с активными животными $p < 0.05$, ** – достоверно по сравнению с активными животными $p < 0.01$.

Данные мониторинга температуры тела и частоты сердцебиения сусликов в период вхождения в состояние зимней спячки [8] показывают, что ингибирование окислительной активности митохондрий печени начинает развиваться только после резкого снижения частоты сердечных сокращений, практически до уровня характерного для периода спячки (1-3 удара в минуту) при температуре тела около 25°C, и развивается относительно быстро, задолго до окончательного снижения температуры и достигает уровня характерного для животных находящихся в состоянии гибернации.

Одновременно с угнетением дыхания для митохондрий гибернирующих сусликов оказалось характерно снижение коэффициента дыхательного контроля по сравнению с величинами характерными для митохондрий активных животных, что говорит о меньшей сопряженности дыхания и фосфорилирования в митохондриях гибернирующих животных (табл. 1).

Низкая скорость разобщенного дыхания митохондрий печени гибернирующих животных является следствием ингибирования дыхания на уровне дыхательной цепи bc1–комплексом (комплекс 3 дыхательной цепи) до цитохромоксидазы. Для того, чтобы проверить действие данного механизма в нашем конкретном измерялась максимальная скорость дыхания в присутствии искусственной пары субстратов, ТМФД в присутствии аскорбата, которые окисляются непосредственно цитохромоксидазой через цитохром С (комплекс 4 дыхательной цепи). Скорость разобщенного дыхания митохондрий печени гибернирующих сусликов была близка к скорости дыхания митохондрий активных животных (табл. 2).

Табл. 2. Скорость разобщенного дыхания митохондрий печени активных, входящих и гибернирующих сусликов при окислении различных субстратов. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Субстраты	Скорость дыхания нг атомов O_2/мин/мг белка			
	Активные (37°C) (n=7)	Входящие (20-25°C) (n=5)	Входящие (10-15°C) (n=5)	Гибернирующие (2-4°C) (n=7)
Сукцинат	131.7±8.5	124.2±5.7	49.0±3.2*	39.6±4.6*
Аскорбат+ТМФД	134.0±7.1	123.3±4.5	111.9±0.9	119.7±10.1**

* – достоверные различия по сравнению с активными животными, $p<0.05$; ** – между всеми группами животных отличия не достоверны.

Заключение. В данном исследовании было продемонстрировано, что подавление окислительной активности препаратов митохондрий печени, выделенных из гибернирующих животных (*Urocitellus undulates),* возникает после начала снижения температуры тела, и полностью развивается на стадии вхождения животного в состояние спячки, при достижении температуры тела 10–15°C. Скорость дыхания в фосфорилирующем состоянии снижается в 4 раза, и разобщенном состоянии снижается в 3 раза. Анализ степени ингибирования максимальной скорости дыхания митохондрий печени в присутствии сукцината и искусственных субстратов дыхания указывает на то, что причиной наблюдаемого подавления окислительной активности митохондрий при входе в состояние гибернации так же, как ранее было показано у животных в состоянии глубокой гибернации, является ингибирование дыхательной цепи митохондрий в области bc1- комплекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калабухов НИ. Спячка млекопитающих. М Наука. 1985. 210 с
2. Chafee RJ, Hooh PL, Lyman OP. Mitochondrial oxidative and phosphorylations in cold exposure and hibernation. Araer J Physiol. 1961;201(1):29-32.
3. Brustovetsky NN, Amerkhanov ZG, Popova EYu, Konstantinov AA. Reversible inhibition of electron transfer in the ubiquinol cytochrome *c* reductase segment of the mitochondrial respiratory chain in hibernating ground squirrels. FEBS Lett. 1990;263(1):73-76.
4. Amerkhanov ZG, Yegorova MV, Markova OV, Mokhova EN. Carboxyatractylat- and cyclosporin A-sensitive uncoupling in liver mitochondria of ground squirrel during hibernation and arousal. Biochem Mol Biol Int. 1996;38(5):863-870.
5. Амерхнов З.Г., Смирнова Н.П., Маркова О.В., Колаева С.Г., Соломонов Н.Г. Участие некоторых белков-переносчиков в терморегуляторном усилении дыхания митохондрий печени и скелетных мышц сусликов (*Citellus undulates*), пробуждающихся из состояния зимней спячки. ДАН. 2004;397(2):1-4.
6. Staples JF, Mathers KE, Duffy BM. Mitochondrial Metabolism in Hibernation: Regulation and Implications. Physiology. 2022; 37:260-271.
7. Fedotcheva NI, Litvinova EG, Kamzolova SV, Morgunov IG. Amerkhanov ZG. Mitochondrial metabolites in tissues as indicator of metabolic alteration during hibernation. CryoLetters. 2010;31(5):392-400.
8. Ignat'ev DA, Sukhova GS, Sukhov VP. The analysis of changes in heart rate and temperature of ground squirrel *Citellus undulatus* in various physiological states. Journal of General Biology. 2001;62(1):75-77.

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛИРУЕМОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ И НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ КРЫС WISTAR

Кулишенко А.А.[1,2], Боков Р.О.[1], Галкин Г.В.[1], Туртикова О.В.[1], Шенкман Б.С.[1]

[1]Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Дыхание митохондрий – важный метаболический процесс, отвечающий за продукцию аденозинтрифосфата (АТФ). Во время космического полета может наблюдаться митохондриальный стресс, вызванный, в том числе, условиями микрогравитации. Митохондрии критически важны для обеспечения мышечной активности и общей энергетической эффективности организма, в целом. На сегодняшний день показано, что гравитационная разгрузка влияет на состояние митохондрий. Так, например, в исследовании с 3-суточным вывешиванием мышей снижались уровни экспрессии генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи и участвующих в окислении жирных кислот идыхательной активности комплексов I и II митохондрий в камбаловидной мышце (*m. soleus*). В свою очередь, наблюдаемые изменения сопровождались повышением содержания активных форм кислорода (АФК) в мышечных волокнах [1]. Электромиостимуляция (ЭМС) рассматривается как перспективный метод коррекции нарушений функционирования митохондрий, которые выражаются в уменьшении работы дыхательной цепи и синтеза АТФ, а также накоплении АФК.

Мы предположили, что гравитационная разгрузка вызовет снижение АДФ-стимулированного и сукцинатного дыхания, а ЭМС – напротив, увеличение этих параметров.

Материалы и методы. Самцов крыс Wistar (возраст: 1.5-2 месяца, вес: 180–210 г) разделили на три группы: CSO – группа виварного контроля с ложной операцией (n=10); HSO – группа животных, подвергнутых ложной операции и 14-суточному антиортостатическому вывешиванию (n=10); HStim – группа животных, подвергнутых 14-суточному антиортостатическому вывешиванию и ЭМС камбаловидной мышцы левой ноги (n=8). Методика вывешивания задних конечностей крыс проводилась по модели Ильина-Новикова в

модификации Морей-Холтон [2]. Хроническую низкочастотную ЭМС (10 Гц, 0.2-0.4 А, 0.4 мс, 8 ч/ сут, 14 сут) осуществляли через седалищный нерв (*n. ischiadicus*) с помощью имплантированных спиральных электродов (имплантация на латеральной поверхности бедра с обеих сторон *n. ischiadicus* выше места его разделения на ветви). В исследованиях использовали камбаловидную мышцу. Подобная методика ЭМС хорошо известна по литературным данным [3].

В работе использовали полярографический метод для измерения дыхательной активности митохондрий. Использовали свежие образцы камбаловидной мышцы (две повторности, ~10 мг ткани). После забора ткани образцы сразу помещали в охлажденный буфер релаксации BIOPS (pH 7,0 (2,77 мМ CaK2EGTA (безводный), 7,23 мМ K2EGTA (безводный), 5,77 мМ Na2ATP, 6,56 мМ MgCl2*6H2O, 20 мМ таурина, 15 мМ Na2фосфокреатинина (безводного), 20 мМ имидазола, 0,5 мМ дитиотреитола (ДТТ), 50 мМ гидрата MES.). Удаляли соединительную и жировую ткани. Далее мышечные волокна механически отделяли друг от друга с помощью игл. После этого добавляли сапонин (конечная концентрация 50 мг/мл) и инкубировали образцы на льду при плавном помешивании. Для удаления остатков детергента и клеточного дебриса выполняли двукратную отмывку препарата по 10 минут в промывочном буфере MiR05 (pH 7.0; 0.5 мМ ЭГТА буфера, 3 мМ MgCl2*6H2O, 60 мМ лактобионовой кислоты, 20 мМ таурина, 10 мМ KH2PO4, 20 мМ HEPES, 110 мМ D-сахарозы, 1 г/л бычьего сывороточного альбумина без жирных кислот). Регистрацию кислородного потребления проводили с помощью полярографа YSI 5300 («YSI», США). Измеряли потребление кислорода, независимое от работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ); потребление кислорода с 2 мМ малатом, 5 мМ пируватом, 10 мМ глутаматом; потребление кислорода с 5 мМ АДФ и 3 мМ MgCl2; потребление кислорода с 10 мМ сукцинатом.

Результаты и обсуждение. «Базальное» дыхание (дыхание, независимое от работы ЭТЦ) не имело различий между группами. Потребление кислорода с малатом, пируватом, глутаматом (дыхание «утечки»; без учета «базального» дыхания, активированы комплексы I, III, IV); АДФ-стимулированное (активация АТФ-синтазы) дыхание и сукцинатное дыхание в группе животных, подвергнувшихся антиортостатическому вывешиванию, было на уровне виварного контроля. Данный результат не означает, что гравитационная разгрузка не повлияла на функционирование мышечных волокон. Анализ литературных данных выявил значительную вариабельность результатов исследований митохондриального дыхания в *m. soleus* при гравитационной разгрузке. Так, на 14 сутках воздействия некоторые авторы наблюдали как повышение, так и понижение параметров дыхания митохондрий [4,5].

Исходя из известных литературных данных, можно предположить сложную динамику митохондриального дыхания. Так, в одной из работ было показано, что в ходе антиортостатического вывешивания сроками 1, 3, 7, 14 суток происходят колебания митохондриального дыхания: сначала параметры уменьшаются, затем увеличиваются, хотя и остаются ниже по сравнению с уровнем контроля. Авторы связывают эти изменения с содержанием десмина [6]. При первых 3 сутках также происходит накопление АТФ [1], что замедляет работу АТФ-синтазы и ЭТЦ. При этом может увеличиваться дыхание «утечки» и повышаться количество АФК, которые повреждают мембрану митохондрий. К 7 суткам уровень АТФ возвращается к исходному уровню, что также может возвращать дыхание митохондрий к уровню до воздействия. Также известно, что повышение содержания ионов кальция, наблюдаемое при гравитационной разгрузке, может стимулировать работу комплексов ЭТЦ и цикла Кребса [1]. Объяснение противоречивости литературных данных может заключаться в различной временной динамике исследуемых параметров в зависимости от сроков гравитационной разгрузки.

В группе HStim зарегистрировано значительное увеличение параметров митохондриального дыхания по сравнению с контрольными группами. Искусственное увеличение уровня физиологической активности мышечных волокон через ЭМС создает выраженную потребность в АТФ. Это может индуцировать экспрессию генов биогенеза митохондрий и стимулировать активность окислительных ферментов. В свою очередь, снижение внутриклеточного содержания ионов кальция по сравнению с повышенным содержанием при вывешивании может способствовать уменьшению окислительного стресса. В совокупности эти факторы могут привести к восстановлению митохондриальной функции.

Таким образом, на 14 сутки гравитационной разгрузки параметры митохондриального дыхания не отличались от контрольных. ЭМС увеличивает дыхание «утечки» относительно виварного контроля, а АДФ-стимулированное и сукцинатное дыхание –относительно обеих групп контроля.

Работа поддержана грантом РНФ №22-15-00151.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шарло К.А., Львова И.Д., Шенкман Б.С. Взаимосвязь окислительного метаболизма и эпигенетической регуляции экспрессии генов в условиях функциональной разгрузки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. – №. 3. – С. 171–187.

2. Morey-Holton E. et al. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data // Advances in space biology and medicine. – 2005. – Vol. 10. – P. 7-40.

3. Kim Y. et al. Application of chronic stimulation to study contractile activity-induced rat skeletal muscle phenotypic adaptations // Journal of Visualized Experiments, 2018. Vol. 131, P. e56827 (1–10).
4. Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S. Effect of support stimulation on unloaded soleus in rat // European Journal of Applied Physiology. – 2002. – Vol. 87. – P. 120-126.
5. Trevino M.B. et al. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2019. – Vol. 317. – №. 5. – P. E899-E910.
6. Mirzoev T.M. et al. Parameters of fiber cell respiration and desmin content in rat soleus muscle at early stages of gravitational unloading // Biophysics. – 2012. – Vol. 57. – P. 377-381.

β-ЭКДИСТЕРОН УЛУЧШАЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ БИОЭНЕРГЕТИКУ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ ПРИ РОТЕНОНОВОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Небесная К.С.[1], Газиева Ш.Ғ.[1,2], Чарышникова О.С.[1], Левицкая Ю.В.[1], Сыров В.Н.[3], Баев А.Ю.[1,2]

[1]Центр передовых технологий, Ташкент, Узбекистан
[2]Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан
[3]Институт химии растительных веществ АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – это неврологическое расстройство, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга. Лечебной терапии для БП не существует. Поэтому обнаружение веществ, которые предотвращают, замедляют, останавливают или смягчают это заболевание, имеет большой интерес.

β-экдистерон – гормон, обнаруженный у членистоногих, который регулирует их развитие. Он также синтезируется рядом растений для борьбы с насекомыми-вредителями. Существует много исследований, показывающих, что β-экдистерон участвует в различных метаболических путях в клетках млекопитающих. Так применение β-экдистерона изменяет митохондриальные функции клеток млекопитающих путем увеличения митохондриального сопряжения и гиперполяризации митохондрий [1]. β-экдистерон может облегчить остеоартрит, активируя аутофагию в хондроцитах посредством регуляции сигнального пути PI3K/AKT/mTOR [2]. Также в сочетании с пеонифлорином β-экдистерон повышает жизнеспособность клеток PC12, подвергшихся воздействию ротенона [3]. β-экдистерон защищает клетки SH-SY5Y от апоптоза, при БП вызванной 6-OHDA, возможно, посредством защиты митохондрий и модуляции p53 через ROS-зависимые пути ASK1-p38(MAPK) [4].

В развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, существует несколько важных факторов, а именно окислительный стресс и гибель нейронов. Использование в лечении антиоксидантов и антиапоптотических агентов, как β-экдистерона, становится многообещающим подходом к борьбе с БП. В этом исследовании раскрываются механизмы нейропротекторного действия β-экдистерона на первичной культуре астроцитов и нейронов при болезни Паркинсона, вызванной ротеноном.

Материалы и методы. Для моделирования нейродегенеративных изменений, характерных для болезни Паркинсона, использовали *in vitro*

сокультуру нейронов и астроцитов, выделенных из среднего мозга новорождённых крысят. Нейродегенеративный процесс индуцировали добавлением ротенона – ингибитора митохондриального комплекса I – в концентрации 1 мкМ на 24 часа.

Для оценки нейропротекторных свойств β-экдистерона, его добавляли в концентрации 50 мкМ одновременно с ротеноном в культуральную среду на 24 часа.

Для анализа состояния митохондрий использовали флуоресцентный краситель TMRM – потенциал-зависимый индикатор. Клетки инкубировали с TMRM, после чего проводили визуализацию с помощью флуоресцентной микроскопии (EVOS FL). Изменения флуоресценции TMRM интерпретировались как показатель динамики митохондриального мембранного потенциала.

Изображения обрабатывались и анализировались с использованием программного обеспечения OriginPro 2021. Статистическая обработка включала оценку достоверности различий между группами (ANOVA, t-тест).

Результаты. Инкубация с ротеноном вызвала значительное снижение митохондриального мембранного потенциала в нейронах, что свидетельствует о нарушении митохондриальной функции. При инкубировании β-экдистерона одновременно с ротеноном, наблюдалось восстановление митохондриального мембранного потенциала до уровня, близкого к контролю, что указывает на нейропротекторный эффект этого соединения.

В астроцитах β-экдистерон повышал митохондриальный мембранный потенциал даже в отсутствии ротенона, что может свидетельствовать о его митохондриально-активирующем действии. При воздействии ротенона также было выражено снижение митохондриального мембранного потенциала в астроцитах, однако совместное применение с β-экдистероном привело к восстановлению митохондриального мембранного потенциала до контрольных значений.

Положительное влияние β-экдистерона на митохондриальный мембранный потенциал нервных клеток млекопитающих неоднократно отмечалось в научной литературе. Однако, несмотря на накопленные данные, молекулярные механизмы этих эффектов до сих пор остаются не до конца выясненными. В связи с этим, мы решили изучить влияние β-экдистерона на функциональное состояние дыхательной цепи митохондрий, а также на работу биоэнергетического аппарата митохондрий в целом, в условиях клеточной модели болезни Паркинсона.

В условиях ротеноновой модели болезни Паркинсона происходит ингибирование работы электрон-транспортной цепи, что нарушает нормальную генерацию митохондриального потенциала. В результате митохондрии активируют компенсаторный механизм: F_1F_o-АТФ-синтаза переключается в режим АТФ-гидролиза, расходуя АТФ для поддержания митохондриального потенциала.

Применение β-экдистерона на фоне ротенона приводит к восстановлению активности электрон-транспортной цепи в нейронах и астроцитах. Это сопровождается снижением участия F_1F_o-АТФ-синтазы в процессах формирования митохондриального потенциала. Добавка олигомицина приводит к росту потенциала на фоне β-экдистерона в нейронах (1.2 % в минуту). В астроцитах добавка олигомицина на фоне β-экдистерона вызывала снижение падения потенциала, в сравнении с модельными клетками в 2.6 раз, что указывает на сохраняющееся участие АТФ-синтазы в поддержании потенциала. Интересно, что β-экдистерон усиливал эффект ротенона как в нейронах, так и в астроцитах в 1.4 раза, что может указывать на повышение активности электрон-транспортной цепи, особенно комплекса I, ингибируемого ротеноном. Это может свидетельствовать о нормализации работы митохондрий за счёт усиления активности дыхательной цепи при применении β-экдистерона.

Таким образом, β-экдистерон способствует нормализации биоэнергетики клеток, снижая энергетические затраты и восстанавливая физиологический режим функционирования митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baev AY, Charishnikova OS, Khasanov FA, Nebesnaya KS, Makhmudov AR, Rakhmedova MT, Khushbaktova ZA, Syrov VN, Levitskaya YV. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2022;219:106066.
2. Tang Y, Mo Y, Xin D, Zeng L, Yue Z, Xu C. β-ecdysterone alleviates osteoarthritis by activating autophagy in chondrocytes through regulating PI3K/AKT/mTOR signal pathway. *Am J Transl Res*. 2020;12(11):7174-7186.
3. Liu H, Yu C, Xu T, Zhang X, Dong M. Synergistic protective effect of paeoniflorin and β-ecdysterone against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Apoptosis*. 2016;21(12):1354-1365.
4. Pan Z, Niu Y, Liang Y, Zhang X, Dong M. β-Ecdysterone Protects SH-SY5Y Cells Against 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis via Mitochondria-Dependent Mechanism: Involvement of p38(MAPK)-p53 Signaling Pathway. *Neurotox Res*. 2016;30(3):453-66.

ЛОКАЛЬНОЕ СОПРЯЖЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ С ПОМОЩЬЮ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Нестеров С.В.[1], Ягужинский Л.С.[2]

[1]Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В настоящее время всё более актуальной становится задача развития высокоэффективных и экологически чистых, так называемых природоподобных технологий, однако при этом в науке до сих пор многие аспекты механизмов функционирования биологических, в том числе биоэнергетических, систем остаются не известными. В настоящей работе предлагается к известным особенностям природных биологических машин-ферментов добавить их способность к самоорганизации и образованию комплексов на надмолекулярном уровне, в которых может происходить локальная и направленная передача метаболитов от фермента к ферменту. Без фундаментальной работы, направленной на чёткое выявление конкретных химических и физических природных механизмов принципиально невозможна реальная работа по их воплощению в каких-либо искусственных молекулах или полимерах, технических узлах и устройствах. Именно поиску и описанию таких природных механизмов функционирования и самоорганизации природных молекулярных биоэнергетических машин в ключевой «биоэнергетической станции» эукариот, митохондриях, посвящена настоящая работа. Будут приведены некоторые результаты нашего научного коллектива за последние несколько лет и анализ данных научных статей, показывающие, что в митохондриях ферментные системы организованы в форме взаимодействующих друг с другом надмолекулярных комплексов, в которых практически на всех стадиях метаболизма может происходить локализованная передача промежуточных метаболитов между ферментами. Это позволяет метаболизму в митохондриях меньше зависеть от скорости диффузии, которая из-за высокой вязкости среды и макромолекулярного краудинга, то есть высокой плотности биополимеров, в матриксе митохондрий может лимитировать работу ферментов.

Результаты. Низкоинвазивные методики криоэлектронной микроскопии позволяют изучать структуры белков и их взаимное расположение в природных условиях в митохондриальных мембранах и в целых митохондриях. В цикле наших работ был сделан акцент на

минимизацию воздействия на мембраны митохондрий, что позволило получить информацию о естественных взаимодействиях ферментов и сравнить эти данные с другими более повреждающими методами. Это позволило собрать уникальную информацию о роли мембраны и белок-липидных взаимодействий в надмолекулярной структуре ферментных систем митохондрий. Благодаря этому подходу впервые в целых митохондриях экспериментально показано, что суперкомплексы дыхательной цепи ориентируются вдоль рядов из димеров АТФ-синтаз и образуют упорядоченные кластеры на складках мембраны [1]. Также экспериментально был показан контакт дегидрогеназных комплексов кетокислот с респирасомами, что дает возможность обмена между ними общими метаболитами - NADH и NAD^+ [2]. Кроме того, впервые в естественных условиях показано, что целостность митохондриальных мембран определяет надмолекулярную организацию кластеров из октамеров креатинкиназ [3]. Собранные данные криоэлектронной томографии митохондрий дрожжей [4], клеток кератиноцитов человека, печени и сердца крыс [5] показали, что в плотность белков в митохондриях не позволяет рассматривать митохондриальный матрикс как классический разбавленный водный раствор, в котором между ферментами происходит диффузия метаболитов через водную фазу. В митохондриях, как и некоторых других частях цитоплазмы, необходимо учитывать наличие макромолекулярного краудинга [5]. На рис.1 показан томографический срез целой митохондрии сердца крысы, наглядно демонстрирующий тесный контакт белков в матриксе. Этот факт с новой силой поднимает вопрос о необходимости компартментализации ферментов, который не раз высказывали в научной литературе [6-8].

Синтез собственных и литературных данных позволил заключить, что обогащенные липидом кардиолипином и обладающие повышенной кривизной мембранные кластеры в митохондриальной мембране обладают небислойной упаковкой жирных кислот липидов, а также из-за особого белково-липидного состава могут считаться одним из подвидов липидных доменов-рафтов, наличие которых ранее не было известно в биоэнергетических мембранах. В митохондриях в таких рафтоподобных структурах формируются полные суперкомплексы всей системы окислительного фосфорилирования, где олигомеры АТФ-синтаз близко стыкованы с респирасомами, а кардиолипин служит важным функциональным элементом, обуславливающим как структурную связь, так и передачу ионов водорода вдоль мембраны. При этом на основе полученных экспериментальных данных становится возможным объяснить и механизм самоорганизации этих кластеров – их упорядочивание обусловлено тем, что они индуцируют анизотропное искривление мембраны, в результате чего происходит сортировка белков

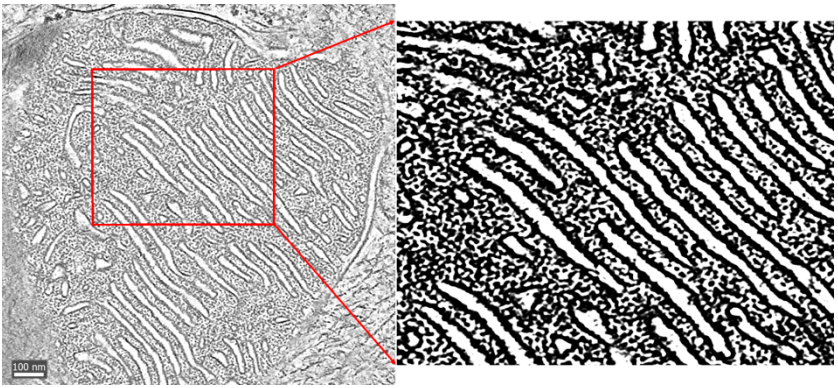


Рис. 1. Срез криоэлектронной томографии интактной митохондрии сердца крысы. На вставке увеличенный в 2.5 раза фрагмент в изменённой гаммой и контрастом, так что белки и мембраны показаны черным цветом, а водная фаза белым. Видно, что в матриксе и внутренней мембране очень плотная упаковка белков и практически отсутствуют белки, не имеющие контактов с соседними. Томография из банка данных, использованного в работе [2].

в кластеры для минимизации энергии деформации липидной части мембраны. Такой принцип организации является энтропийным и может сравниваться с гидрофобными взаимодействиями, с той разницей, что при гидрофобных взаимодействиях происходит максимизация энтропии воды, а в случае кластеризации мембранных белков происходит максимизация энтропии фосфолипидов. Аналогичным образом за счёт минимизации энергии липидов, реализуется хорошо известный и описанный в литературе феномен сортировки или кластеризация мембранных белков в зависимости от толщины гидрофобной зоны (hydrophobic mismatch)[9]. Взаимодействие АТФ-синтаз и респирасом таким образом обусловлено нековалентными взаимодействиями с мембраной и наблюдается только в экспериментах, в которых белки находятся в природных мембранах. Функциональная значимость этого взаимодействия заключается в том, что передача протонов, согласно множеству экспериментальных данных происходит по межфазной границе (см. обзор[10]), причём при близком контакте с протонными помпами АТФ-синтаза работает быстрее и потери энергии меньше [11].

Значимую роль в надмолекулярной структуре белков играют также слабые мультивалентные взаимодействия неупорядоченных полимерных цепочек белков и нуклеиновых кислот в матриксе митохондрий [5]. Этот вид взаимодействий стал пристально исследоваться сравнительно недавно, и в настоящее время установлено, что благодаря ему собирается

большое количество как крупных конденсатов в клетке, называемых безмембранными органеллами [12], так и сравнительно небольших конденсатов, служащих для сборки отдельных ферментных систем – например, систем трансляции, репарации ДНК, и даже гликолиза [13]. Предварительный анализ показывает, что за счёт связи с некодирующими РНК ферменты цикла Кребса также могут ассоциировать друг с другом [5], как это происходит для гликолитических ферментов.

Анализ совокупности собственных и литературных данных позволяет заключить, что в митохондриях сердца для достижения наибольшей эффективности биоэнергетических процессов формируются лабильные структурно связанные метаболические кластеры размерами от десятков до сотней нанометров, в которых происходит последовательное каналирование метаболитов между ферментами с минимальной зависимостью от свободной диффузии. Эта цепочка последовательных процессов начинается от поступления в митохондрию первичных субстратов (пирувата, жирных кислот, аминокислот) и заканчивается формированием АТФ или фосфокреатина, выходящими из митохондрии через белковые каналы внешней мембраны для обеспечения энергетических потребностей кардиомиоцита. Более того, вся система биоэнергетики находится на границе фазового перехода между бислойной и небислойной упаковкой липидов[14], в результате чего становится возможным с помощью небольших изменений условий (например, концентрации ионов кальция, осмотического давления, температуры, pH, перекисном окислении липидов) менять свойства мембраны и тем самым индуцировать масштабные перестройки в структуре и функции митохондрий. Таким образом, достигается высокая адаптивность системы и ее способность к быстрым перестройкам при стрессе или изменении метаболического состояния клетки.

На рис. 2 представлена схема структуры митохондрий, учитывающая помимо привычной структуры кристы с АТФ-синтазами в области изгиба, также латеральный перенос по мембране протонов от близко расположенных респирасом, которые, в свою очередь, связаны со стороны матрикса с различными дегидрогеназами, осуществляющими реакции в рамках цикла Кребса или бета-окисления жирных кислот. Также учитывается наличие кластера креатинкиназ в межмембранном пространстве, которые, по данным литературы взаимодействуют с транспортерами внешней мембраны (VDAC) и обменниками адениновых нуклеотидов (ANT) [15]. Учитывается также возможность формирования конденсатов в матриксе, а также их налипания на митохондрию со стороны цитозоля. Особенно важны с точки зрения биоэнергетики возможность налипания на митохондрии липидных гранул с жирными кислотами – субстратами бета-окисления, стресс-гранул, способных

нарушать работу каналов внешней мембраны [16], а также гликолитических телец, которые могут получать из митохондрии АТФ для работы гексокиназы и отдавать в митохондрию вырабатываемый пируват [17], а также регулировать слияние митохондрий [18].

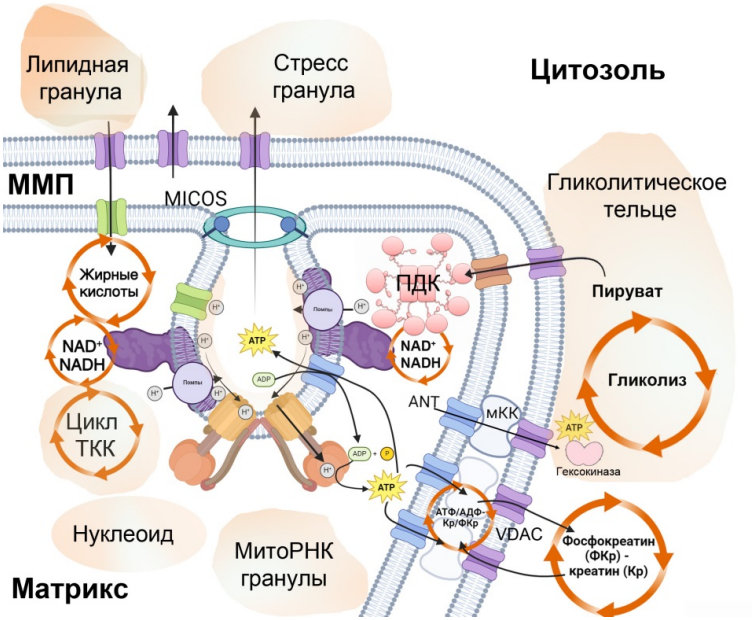


Рис. 2. Упрощённая схема устройства митохондрии, с учётом кластеризации ферментных систем.

Заключение. Проведенная серия исследований с помощью криоэлектронной томографии митохондрий, биоинформатический анализ, а также анализ научной литературы показали наличие ранее неизвестных форм надмолекулярной организации биоэнергетических мембранных систем и позволяют предположить, что их регуляция происходит за счет влияния на фазовую сепарацию биополимеров во внутренней мембране и в матриксе митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nesterov S. et al. Ordered Clusters of the Complete Oxidative Phosphorylation System in Cardiac Mitochondria // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, No 3. P. article number 1462.
2. Plokhikh K.S. et al. Association of 2-oxoacid dehydrogenase complexes with respirasomes in mitochondria // FEBS J. 2024. Vol. 291, No 1. P. 132-141.

3. Chesnokov Yu.M. et al. Structure of Supramolecular Clusters of Creatine Kinases in the Intermembrane Space of Mitochondria // Nanobiotechnology Rep. 2024. Vol. 19, No 6. P. 1008-1015.
4. Nesterov S.V. et al. Safari with an Electron Gun: Visualization of Protein and Membrane Interactions in Mitochondria in Natural Environment // Biochem. Mosc. 2024. Vol. 89, No 2. P. 257-268.
5. Nesterov S.V. et al. Order wrapped in chaos: On the roles of intrinsically disordered proteins and RNAs in the arrangement of the mitochondrial enzymatic machines // Int. J. Biol. Macromol. 2024. Vol. 267. P. 131455.
6. Srere P.A. Is there an organization of krebs cycle enzymes in the mitochondrial matrix? // Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria / ed. Mehlman M.A., Hanson R.W. Academic Press, 1972. P. 79-91.
7. Jourdain A.A. et al. Mitochondrial RNA granules: Compartmentalizing mitochondrial gene expression // J. Cell Biol. 2016. Vol. 212, No 6. P. 611-614.
8. Zhang Y., Fernie A.R. Metabolons, enzyme-enzyme assemblies that mediate substrate channeling, and their roles in plant metabolism // Plant Commun. 2021. Vol. 2, No 1. P. 100081.
9. Schmidt U., Guigas G., Weiss M. Cluster Formation of Transmembrane Proteins Due to Hydrophobic Mismatching // Phys. Rev. Lett. 2008. Vol. 101, No 12. P. 128104.
10. Nesterov S.V., Smirnova E.G., Yaguzhinsky L.S. Mechanism of Energy Storage and Transformation in the Mitochondria at the Water-Membrane Interface // Biochem. Mosc. 2022. Vol. 87, No 2. P. 179-190.
11. Sjöholm J. et al. The lateral distance between a proton pump and ATP synthase determines the ATP-synthesis rate: 1 // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, No 1. P. 1-12.
12. Nesterov S.V., Ilyinsky N.S., Uversky V.N. Liquid-liquid phase separation as a common organizing principle of intracellular space and biomembranes providing dynamic adaptive responses // Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 2021. Vol. 1868, No 11. P. article number 119102.
13. Jin M. et al. Glycolytic Enzymes Coalesce in G bodies Under Hypoxic Stress // Cell Rep. 2017. Vol. 20, No 4. P. 895-908.
14. Garab G. et al. Structural and functional roles of non-bilayer lipid phases of chloroplast thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes // Prog. Lipid Res. 2022. Vol. 86. P. 101163.
15. Guzun R. et al. Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, No 6. P. 1545-1554.
16. Amen T., Kaganovich D. Stress granules inhibit fatty acid oxidation by modulating mitochondrial permeability // Cell Rep. 2021. Vol. 35, No 11. P. 109237.
17. Graham J.W.A. et al. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling // Plant Cell. 2007. Vol. 19, No 11. P. 3723-3738.
18. Pilic J. et al. Hexokinase 1 forms rings that regulate mitochondrial fission during energy stress // Mol. Cell. 2024. Vol. 84, No 14. P. 2732-2746.e5.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В НАТИВНОМ ЛИПИДНОМ ОКРУЖЕНИИ С ПОМОЩЬЮ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Новождён М.В.[1], Нестеров С.В.[1], Чесноков Ю.М.[1], Жарова Т.В.[2], Гривенникова В.Г.[2], Ягужинский Л.С.[2]

[1]Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В настоящее время становится всё более очевидным, что липиды в биологических мембранах влияют на структуру и функционирование мембранных белков. В то же время классические методы, используемые для определения атомарной структуры мембранных белков, сталкиваются с рядом трудностей. Так для рентгеноструктурного анализа необходима кристаллизация образца, что неизбежно влияет на результирующую конформацию белка. Для мембранных белков подобные манипуляции особенно критичны в виду их сильной зависимости от липидного окружения с одной стороны и водной фазы с ионным и молекулярным окружением с другой [1,2] . В совокупности количество исследованных структур мембранных белков кратно меньше водорастворимых [1]. При использовании методов криоэлектронной микроскопии в большинстве случаев также используются очищенные белки, гидрофобные зоны которых стабилизируются различными детергентами, или же встраиванием белков в искусственные бислойные системы (например, нанодиски). При этом в любом случае нарушается нативное липидное окружение, и структура белка может модифицироваться. Кроме того, что особенно актуально для задач биоэнергетики, структура белков практически не исследуется в присутствии электрохимического трансмембранного потенциала. Недавно в этом направлении был достигнут существенный прогресс. Были получены структуры белков дыхательной цепи и АТФ-синтаз митохондрий одноклеточной водоросли в интактных митохондриях в целых клетках[3]. Однако для исследования структур белков млекопитающих из-за высокой плотности белков и липидов в митохондриях аналогичный подход малоэффективен [4].

Мембранные белки митохондрий, включая комплексы дыхательной цепи и АТФ-синтазу, функционируют в уникальной липидной среде внутренней мембраны, богатой анионным липидом конической формы –

кардиолипином [5,6], а также при высоком трансмембранном потенциале. Для изучения структурных аспектов функционирования таких ферментов *in situ* необходимо воспроизводить максимально близкие к нативным условия. Ранее нам удалось показать, что мембраны митохондрий, разрушенных в результате действия сил поверхностного натяжения, подходят для исследования в митохондриях сердца АТФ-синтаз [7] и суперкомплексов дыхательной цепи [8]. Удалось получить с помощью субтомографического усреднения структуру мономеров и димеров АТФ-синтаз, включая их мембранную часть, с разрешением 13-15 Å [7]. Крио-ЭМ плотности АТФ-синтаз в нативной мембране показали высокое сходство со структурами, полученными на выделенных из мембран АТФ-синтазах (Рис. 1), однако достигнутое разрешение не позволило судить об атомарной структуре. Сохранение значительной части белков матрикса митохондрий в полученных образцах и разнородность размеров фрагментов мембран осложняли идентификацию и классификацию белков, в результате чего подклассы АТФ-синтаз, отличающиеся различным поворотом роторных субъединиц не удалось различить. Также большинство фрагментов внутренней мембраны после разрушения митохондрий не были замкнуты, что не позволяло исследовать белки в присутствии электрического трансмембранного потенциала.

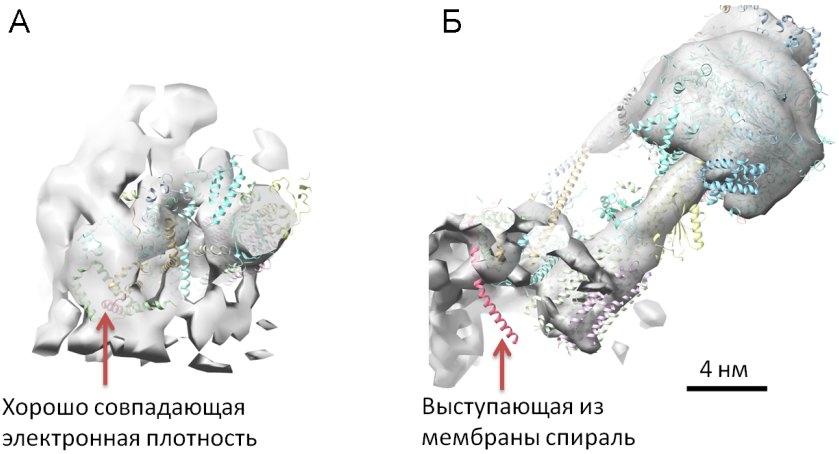


Рис. 1. Сравнение димера АТФ-синтазы митохондрий сердца крысы, полученного субтомографическим усреднением на фрагментах мембран митохондрий (показана карта крио-ЭМ плотности с фиксированным порогом отображения) и структуры димера АТФ-синтазы митохондрий быка (PDB 6zqn), полученной на выделенном ферменте. А. Вид сбоку на мембрану в разрезе. Б. Вид на мембранный фрагмент со стороны F_1 фактора (сам F_1 скрыт).

Для устранения недостатков предыдущих исследований белков системы окислительного фосфорилирования митохондрий (ОСКФОС) в нативных мембранах предлагается использовать субмитохондриальные частицы (СМЧ). Они повторяют липидный состав митохондриальных мембран, содержат все необходимые для окислительного фосфорилирования мембранные комплексы и способны синтезировать АТФ. При этом СМЧ очищены от белков матрикса митохондрий и обладают всеми преимуществами искусственных липосом – подходящими для криоэлектронной микроскопии и томографии размерами, способностью поддерживать потенциал.

Использование липосом и липидных везикул широко распространено для исследования различных параметров мембраны таких как кривизна поверхности, влияние водного и ионного окружения, проводимость, фазовые переходы липидов. [9–11] Таким образом СМЧ позволяют реконструировать биоэнергетические мембраны in vitro без использования детергентов, сохраняя при этом взаимодействие белковых комплексов с липидами и по крайней мере некоторые свойства надмолекулярной организации, которые характерны для целых митохондрий. Это особенно важно при использовании криоэлектронной микроскопии в режиме single particle или субтомографического усреднения, где стабильность кривизны мембранной системы критичны для получения структурных данных в хорошем разрешении [12].

Материалы и методы. Получение СМЧ из сердца быка проводилось с помощью ультразвуковой обработки митохондрий с последующим центрифугированием, как описано ранее [13]. СМЧ хранились в жидком азоте и использовались в экспериментах после проверки дыхательной активности. При подготовке к исследованию с помощью криоэлектронной томографии в суспензию СМЧ добавлялись частицы коллоидного золота (10 nm Colloidal Gold Labeled Protein A, UMC Utrecht, Нидерланды), в дальнейшем используемые как маркеры для более точного выравнивания томограмм. Далее производилась энергизация мембран добавлением сукцината калия (10 мМ) при 20°C. 3 мкл полученного раствора наносили на обработанную в тлеющем разряде микроскопическую сетку (01895-F, Ted Pella, США) и подвергали промакиванию в течении 2,5 с и витрификации в жидком этане в Vitrobot Mark IV (влажность 100% и температура 20˚C). Витрифицированные образцы хранились в жидком азоте. Криогенная электронная томография проводилась с помощью микроскопа Titan Krios 60-300 TEM/STEM (Thermo Fisher Scientific, США), как описано ранее в наших работах для митохондриальных мембран [8]. Сегментация мембранных поверхностей проводилась с использованием алгоритмов искусственного интеллекта

MemBrain [14]. С помощью программного пакета IMOD производилась разметка координат мембранных белковых комплексов в ручном режиме.

Результаты. Томографические реконструкции позволили предварительно оценить распределение белков по поверхности СМЧ. Для АТФ-синтаз наблюдалась упорядоченная ориентация в мембране, как и ожидалось для инвертированных СМЧ – все F_1 факторы АТФ-синтаз находились снаружи везикул. При этом также наблюдалось образование олигомерных линейных структур из димеров на участках мембраны, обладающих выраженной кривизной. Такое расположение характерно для АТФ-синтаз и в целых митохондриях.

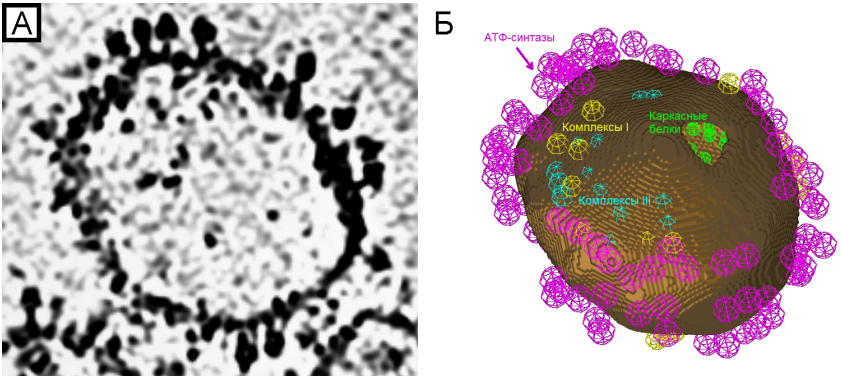


Рис. 2. А. Срез томограммы СМЧ с F_1 АТФ-синтаз. Б. Реконструкция поверхности СМЧ с отмеченными вручную белковыми комплексами АТФ-синтаз, комплексами I и III, и каркасными белками, стабилизирующими мембрану (вероятно, ora1).

Для АТФ-синтазы фиксировалась ориентация с F_1-фактором наружу. Это соответствовало предполагаемой ориентации в *in vivo* системах. Белки сохраняли нативные междоменные взаимодействия. В области соприкосновения с белками выявлялось локальное уплощение или искривление мембраны — признак характерного для АТФ-синтаз взаимодействия с липидной частью мембраны. Были обнаружены также каркасные белки, взаимодействующие с мембраной и формирующие олигомеры на её поверхности, по размерам и форме близкие к ora1. Для более точной идентификации этих белков требуются дальнейшие исследования, но их наличие указывает на частичное сохранение в СМЧ регуляторных систем, управляющих структурой внутренней мембраны митохондрий.

СМЧ, благодаря своим размерам (от 50 до 200 нм), оптимально подходят для визуализации крупномолекулярных комплексов в условиях,

приближенных к митохондриальной среде. Получение однородных по размеру образцов может позволить также применить метод усреднения одиночных частиц, существенно улучшающий потенциально достижимое разрешение усреднённых структур. Образцы СМЧ подходят для обучения нейросетевых алгоритмов и дальнейшего налаживания автоматического поиска белков интереса, таких как АТФ-синтазы, комплексы I и III дыхательной цепи. Нативный белковый и липидный состав мембран дает возможность изучать белок-белковые и белок-липидные контакты, изменения кривизны мембраны при изменении внешних условий (ионной силы, осмотического давления, температуры) или электрического потенциала. Это открывает новые возможности для анализа кооперативных эффектов, таких как кластеризация белков и фазовая сепарация липидов, позволяет исследовать как изменения надмолекулярной структуры мембраны влияют на активность белков системы окислительного фосфорилирования.

Выводы. СМЧ являются эффективной модельной системой для структурного изучения митохондриальных белков. Они обеспечивают нативное липидное окружение, естественный белковый состав, сохраняют локальную кривизну мембраны около АТФ-синтаз. Совмещение СМЧ с методами крио-ЭМ и томографии позволяет проводить исследования на уровне, по ряду параметров сопоставимом с *in situ* системами (интактные митохондрии или фрагменты мембран), но с более высоким разрешением и с возможностью более точного контроля условий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gerle C. Essay on Biomembrane Structure. Journal of Membrane Biology. 2019;252(2-3):115-130. doi:10.1007/s00232-019-00061-w
2. Heimburg T. Thermal Biophysics of Membranes (Tutorials in Biophysics).
3. Waltz F, Righetto RD, Lamm L, et al. In-cell architecture of the mitochondrial respiratory chain. Science (1979). 2025;387(6740):1296-1301. doi:10.1126/science.ads8738
4. Nesterov S V., Ilyinsky NS, Plokhikh KS, et al. Order wrapped in chaos: On the roles of intrinsically disordered proteins and RNAs in the arrangement of the mitochondrial enzymatic machines. Int J Biol Macromol. 2024;267:131455. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.131455
5. Haines TH, Dencher NA. Cardiolipin: A Proton Trap for Oxidative Phosphorylation.
6. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. Cells. 2019;8(7):728. doi:10.3390/cells8070728
7. Нестеров СВ, Чесноков ЮМ, Камышинский РА, Ягужинский ЛС, Василов РГ. Определение расположения и структуры АТФ-синтетазы в мембранах митохондрий сердца крыс с помощью крио-электронной томографии. Российские

нанотехнологии. 2020;15(1):93-100. doi:10.1134/S1992722320010136
8. Nesterov S, Chesnokov Y, Kamyshinsky R, et al. Ordered Clusters of the Complete Oxidative Phosphorylation System in Cardiac Mitochondria. Int J Mol Sci. 2021;22(3):1462. doi:10.3390/ijms22031462
9. Dimova R, Bezlyepkina N, Jordö MD, et al. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. Soft Matter. 2009;5(17):3201-3212. doi:10.1039/b901963d
10. Bossa GV, Gunderson S, Downing R, May S. Role of transmembrane proteins for phase separation and domain registration in asymmetric lipid bilayers. Biomolecules. 2019;9(8). doi:10.3390/biom9080303
11. Neunert G, Tomaszewska-Gras J, Baj A, Gauza-Włodarczyk M, Witkowski S, Polewski K. Phase Transitions and Structural Changes in DPPC Liposomes Induced by a 1-Carba-Alpha-Tocopherol Analogue. Molecules. 2021;26(10):2851. doi:10.3390/molecules26102851
12. Bonomi M, Vendruscolo M. Determination of protein structural ensembles using cryo-electron microscopy. Curr Opin Struct Biol. 2019;56:37-45. doi:10.1016/j.sbi.2018.10.006
13. Grivennikova VG, Gladyshev G V., Vinogradov AD. Deactivation of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I): Extrinsically affecting factors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2020;1861(8):148207. doi:10.1016/j.bbabio.2020.148207
14. Lamm L, Zufferey S, Righetto RD, et al. MemBrain v2: an end-to-end tool for the analysis of membranes in cryo-electron tomography. Published online January 5, 2024. doi:10.1101/2024.01.05.574336

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ХЕНОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ИНКУБИРУЕМЫХ В СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО ИОННОГО СОСТАВА

Павлова Е.К., Самарцев В.Н.

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

Введение. Хенодезоксихолевая кислота (ХДХК) известна как один из природных разобщителей окислительного фосфорилирования в митохондриях печени [1,2]. Эта первичная желчная кислота, наряду с холевой кислотой, а также с их глициновыми и тауриновыми конъюгатами, синтезируется в клетках печени [3]. При холестазе, вызванном нарушением оттока желчи, эти желчные кислоты могут накапливаться в клетках этого органа вплоть до концентрации 800 мкМ [4]. Одним из эффективных методов оценки эффектов протонофорных разобщителей окислительного фосфорилирования, в том числе и желчных кислот, является стимуляция дыхания митохондрий [1,2,5]. Недавно нами [2] установлено, что при условии инкубации митохондрий печени в сахарозной среде с ионами калия зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации ХДХК нелинейная и описывается параболическим уравнением. При этих условиях специфический ингибитор ADP/ATP-антипортера – карбоксиатрактилат и субстрат аспартат/глутаматного антипортера – глутамат не влияют на стимулированное этими желчными кислотами дыхание митохондрий. Было предположено, что такое стимулирующее действие ХДХК связано с формированием димерной формы – комплекса аниона с кислотой. При этом часть анионов ХДХК будет аккумулироваться в матриксе и не участвовать в разобщении [2]. Нигерицин, индуцируя в митохондриях печени превращение ΔpH в $\Delta\psi$, существенно изменяет характер разобщающего действия желчных кислот. В присутствии этого ионофора зависимость скорости дыхания от концентрации ХДХК линейная. При этих условиях карбоксиатрактилат ингибирует стимулируемое ХДХК дыхание, что свидетельствует об участии ADP/ATP-антипортера в процессе разобщения [2]. Эти данные были получены только при использовании одной среды инкубации – сахарозной содержащей 20 мМ KCl (среда А). Представляет интерес исследовать разобщающее действие ХДХК в митохондриях печени при условии их инкубации в средах различного ионного состава: сахарозной не содержащей KCl (среда Б), а также содержащей лишь KCl без сахарозы (среда В). При проведении исследований особое внимание было уделено влиянию на разобщающее действие ХДХК проникающих ионов: аниона фосфата (P_i), способного

также как и нигерицин индуцировать в митохондриях печени превращение ΔpH в Δψ [6]; катиона додецилтрифенилфосфония (C_{12}TPP), способного усиливать разобщающее действие жирных кислот путем формирования нейтрального комплекса катиона C_{12}TPP и аниона жирной кислоты [7].

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 [5]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25ºС в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания). Скорость дыхания митохондрий выражали как нмоль O_2/мин на 1 мг белка. Использовали следующие среды инкубации: среда А содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили Трис); среда Б, аналогичная среде А, но не содержала KCl, в этом случае концентрация сахарозы увеличена до 250 мМ; среда В, аналогичная среде Б, но содержала 130 мМ KCl вместо 250 мМ сахарозы. Разобщающее действие ХДХК в митохондриях была выражена количественно как величина стимуляции дыхания в состоянии 4 непосредственно после внесения ХДХК ($\Delta J_{U0}=J_{U0}-J_4$) и через 7 минут после этого ($\Delta J_{U7}=J_{U7}-J_4$), где J_4, J_{U0} и J_{U7} – скорости дыхания соответственно в состоянии 4 и в присутствии ХДХК. Количество освобожденного цитохрома С из межмембранного пространства в среду инкубации определяли классическим спектрофотометрическим методом при длине волны 414 нм на спектрометре “Ocean Optics FLAMET-UV-VIS”, как подробно описано в работе [8].

Результаты и их обсуждение. Как видно из таблицы 1, 80 мкМ ХДХК эффективно стимулирует дыхание митохондрий печени инкубируемых в сахарозной среде инкубации содержащей K^+ (среда А). Вместе с тем эффект ХДХК существенно ослабляется через 7 минут после инкубации митохондрий (табл. 1). В отсутствие K^+ в сахарозной среде инкубации (среда Б) ХДХК стимулирует дыхание митохондрий менее существенно менее эффективно. Однако в этом случае эффект ХДХК не зависит от времени инкубации митохондрий (табл. 1). Через 10 минут после внесения желчной кислоты добавление 50 мкМ ДНФ к митохондриям инкубируемых в средах А и Б стимулирует дыхание в равной степени (табл. 1). При инкубации митохондрий в KCl-среде (среда В) ХДХК стимулирует дыхание в меньшей степени, чем в среде А и при этих условиях 50 мкМ ДНФ стимулирует дыхание в менее эффективно (табл. 1), что свидетельствует об ингибировании транспорта электронов по

дыхательной цепи. Можно было бы предположить, что K^+ в высокой концентрации способен ослаблять стимулирующее действие ХДХК. Однако, как установлено нами, инкубация митохондрий с ХДХК в среде В приводит к выходу цитохрома С из межмембранное пространство в среду инкубации (данные не приведены). Следовательно, более низкая разобщающая активность ХДХК в среде В, чем в среде А может быть обусловлена освобождением цитохрома С и вследствие этого ингибированием транспорта по дыхательной цепи. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что для эффективного разобщающего действия ХДХК в митохондриях печени необходимо наличие ионов калия в среде инкубации. Однако в этом случае разобщающая активность ХДХК снижается с течением времени, что может быть связано с аккумуляцией этой желчной кислоты в матриксе митохондрий. Можно предположить, что ионы калия необходимы для формирования димерной формы ХДХК – комплекса аниона с кислотой.

Табл. 1. Сравнение скорости дыхания митохондрий печени инкубируемых в различных средах в отсутствии (J_4) и в присутствии (J_{U0} и J_{U7}) 80 мкМ ХДХК.

Среды инкубации	Скорость дыхания, нмоль O_2/мин на 1 мг белка					
	J_4	J_{U0}	ΔJ_{U0}	J_{U7}	ΔJ_{U7}	$J_{днф}$
Среда А	9,4±0,4	27,1±1,1	17,7±0,8	17,6 ± 0,7	8,2±0,3	52,9± 2,1
Среда Б	8,9±0,3	14,5±0,4*	5,6±0,2*	14,5±0,4*	5,6±0,2*	54,0 ± 1,9
Среда В	9,1±0,2	16,7±0,5*	7,6±0,2*	14,8±0,5*	5,7±0,2*	21,9±0,9*

Примечание. Условия опыта, состав сред инкубации и приведенные в таблице символы описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). * Различие между данными полученными при использовании среды А и других сред (Б или В) статистически значимы, $p < 0,01$ (критерий Стьюдента).

Как уже отмечалось во введении P_i, также как нигерицин, индуцирует в митохондриях печени превращение ΔpH в $\Delta\psi$ [6]. Ранее нами было показано, что при инкубации митохондрий в среде А нигерицин ингибирует дыхание митохондрий индуцируемое 80 мкМ ХДХК, в этом случае эффект этой желчной кислоты не зависит от времени инкубации митохондрий [2]. В настоящей работе установлено, что аналогичным действием обладает и P_i (данные не приведены). Таким образом, полученные результаты подтверждают ранее сделанный вывод о том, что превращение различными путями ΔpH в $\Delta\psi$ приводит к модификации разобщающего действия ХДХК.

В следующих экспериментах было исследовано влияние C_{12}TPP на разобщающее действие ХДХК в митохондриях печени. Как уже отмечалось выше, этот катион способен усиливать разобщающее действие жирных кислот [7]. В настоящей работе установлено, что 3 мкМ C_{12}TPP

существенно усиливает разобщающее действие 20 мкМ пальмитиновой кислоты: увеличивает ΔJ_{U0} на 85%. В таблице 2 приведены результаты исследования влияния C_{12}TPP на разобщающее действие ХДХК. Как видно из таблицы, C_{12}TPP в концентрациях 2 и 3 мкМ эффективно стимулирует дыхание митохондрий в состоянии 4 (J_4), не оказывая существенного влияния на скорость дыхания стимулируемое ХДХК (J_{U0} и ΔJ_{U0} не изменяются). Вместе с тем, C_{12}TPP препятствует снижению разобщающей активности ХДХК (J_{U7} и ΔJ_{U7} увеличиваются) в течение 7 минут инкубации митохондрий (табл. 2). Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что C_{12}TPP не влияет на разобщающее действие ХДХК но, по-видимому, препятствует аккумуляции этой желчной кислоты в матриксе митохондрий. По-видимому, желчные кислоты существенно отличаются от жирных кислот по механизму разобщающего действия.

Табл. 2. Влияние C_{12}TPP на скорость дыхания митохондрий печени, инкубируемых в среде А, в отсутствии (J_4) и в присутствии (J_{U0} и J_{U7}) 80 мкМ ХДХК.

Условия опыта	Скорость дыхания, нмоль O_2/мин на 1 мг белка					
	J_4	J_{U0}	ΔJ_{U0}	J_{U7}	ΔJ_{U7}	$J_{днф}$
Без C_{12}TPP	8,7±0,4	24,5±1,2	15,8±1,1	13,3±0,7	4,6±0,6	50,6±3,3
C_{12}TPP 2 мкМ	11,7±0,4*	26,7±1,1	15,0±0,5	19,7±0,7*	8,0±0,4*	58,0±1,7
C_{12}TPP 3 мкМ	13,1±0,6*	27,5±1,3	14,4±0,6	22,1±1,3*	9,0±0,8*	67,3±3,1*

Примечание. Условия опыта, состав сред инкубации и приведенные в таблице символы описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). * Различие между опытом (присутствие C_{12}TPP) и контролем (Без C_{12}TPP) статистически значимы, $p < 0,01$ (критерий Стьюдента).

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 25-24-00030).

ЛИТЕРАТУРА

1. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. Toxicol. Sci. 2000;57:177-185.
2. Pavlova EK, Samartsev VN, Dubinin MV. Nigericin modifies the mechanism of the uncoupling action of bile acids in rat liver mitochondria by converting ΔpH into Δψ. J. Bioenerg. Biomembr. 2025;57:39-48.
3. Shulpekova Y, Shirokova E, Zharkova M, Tkachenko P, Tikhonov I, Stepanov A, Sinitsyna A, Izotov A, Butkova T, Shulpekova N, NechaevV, Damulin I, Okhlobystin A, IvashkinVA. Recent ten-year perspective: bile acid metabolism and signaling. Molecules. 2022;27:1983.

4. Schulz S, Schmitt S, Wimmer R, Aichler M, Eisenhofer S, Lichtmannegger J, Eberhagen C, Artmann R, Tookos F, Walch A, Krappmann D, Brenner C, Rust C, Zischka H. Progressive stages of mitochondrial destruction caused by cell toxic bile salts. Biochim. Biophys. Acta. 2013;1828(9):2121-2133.
5. Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. Involved of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 1997;1339:251-257.
6. Bodrova ME, Dedukhova VI, Samartsev VN, Mokhova EN. Role of ADP/ATP-antiporter in fatty acid-induced uncoupling of ca2+-loaded rat liver mitochondria. IUBMB Life. 2000; 50:189-194.
7. Severin FF, Severina II, Antonenko YN, Rokitskaya TI, Cherepanov DA, Mokhova EN, Vyssokikh MY, Pustovidko AV, Markova OV, Yaguzhinsky LS, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Skulachev MV, Skulachev VP. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107(2):663-668.
8. Дубинин МВ, Ведерников АА, Хорошавина ЕИ, Самарцев ВН. Индукция α,ω-гексадекандиоловой кислотой кальций-зависимой циклоспорин А-нечувствительной неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий печени и освобождения цитохрома с в средах различной ионной силы. Биохимия. 2014;79(6):724-731.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОКАРБОНОВЫХ И α,ω-ДИКАРБОНОВЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С МИТОХОНДРИЯМИ ПЕЧЕНИ, В ТОМ ЧИСЛЕ И ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ

Павлова С.И., Самарцев В.Н., Дубинин М.В.

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

Введение. В клетках печени от 20 до 30% потребления кислорода митохондриями не сопряжено с синтезом АТР. Такое потребление кислорода митохондриями, называемое также «свободным дыханием» имеет важное физиологическое значение [1,2]. В качестве природных индукторов свободного дыхания рассматриваются свободные монокарбоновые и α,ω-дикарбоновые жирные кислоты [1, 3-5]. Так одна из наиболее распространенных природных монокарбоновых жирных кислот пальмитиновая кислота (ПК) стимулирует свободное дыхание митохондрий печени главным образом путем усиления пассивной утечки протонов при участии белков переносчиков анионов внутренней мембраны ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров [3,5]. В отличие от этого α,ω-тетрадекандикарбоновая (ТДК) и α,ω-гексадекандикарбоновая (ГДК) способны в отсутствие синтеза АТР стимулировать дыхание митохондрий печени без усиления пассивной утечки протонов [4]. Было предположено, что такое действие ТДК и ГДК обусловлено переключением комплекса III (bc_1-комплекс) дыхательной цепи на холостой режим работы, при котором транспорт электронов не сопряжен с переносом протонов из матрикса в межмембранное пространство [4]. Вместе с тем, нельзя исключить и то, что указанные жирные кислоты, будучи детергентами, способны разрушать внутреннюю мембрану митохондрий, что также может быть причиной стимуляции дыхания. Увеличение содержания свободных монокарбоновых жирных кислот в жизненно важных органах наблюдается при некоторых патологических состояниях: синдром Рея, ожирение, голодание, сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени и др. [4,6]. В свою очередь накопление монокарбоновых жирных кислот сопровождается усилением их ω-окисления, что приводит к увеличению содержания α,ω-дикарбоновых кислот, в том числе ТДК и ГДК [4,6]. Интересно отметить, что ГДК также как ПК в концентрациях, вызывающих приблизительно в равной степени стимуляцию дыхания митохондрий в состоянии 4, одинаково эффективно ингибируют генерацию пероксида водорода [4], что предполагает участие α,ω-дикарбоновых кислот в защите клеток от повреждающего действия активных форм кислорода и в редокс регуляции метаболических процессов. Очевидно, что одновременное накопление

монокарбоновых и α,ω-дикарбоновых кислот в клетках при указанных патологиях предполагает их влияние на эффекты друг друга в процессе разобщения окислительного фосфорилирования.

Методы исследования. 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 [5]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-Tris (pH 7,4). Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25ºС в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания). Скорость дыхания митохондрий выражали как нмоль O_2/мин на 1 мг белка. 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). Повреждение внутренней мембраны митохондрий определяли как в работе [7] путем измерения стимуляции дыхания митохондрий при добавлении NADH, который не способен транспортироваться через внутреннюю мембрану интактных органелл [1]. Среда инкубации аналогична указанной выше, но янтарная кислота была заменена 5 мкМ цитохромом.

Результаты. Как видно из табл. 1, митохондрии печени, разрушенные путем трехкратного замораживания/оттаивания, с высокой скоростью окисляют NADH. ПК и ГДК в указанных в таблице концентрациях не влияют на скорость окисления NADH. Следовательно, эти жирные кислоты не влияют на транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий. Интактные митохондрии печени, в отличие от разрушенных, потребляют кислород и при окислении эндогенных субстратов (табл. 1). В этом случае внесение NADH приводит к последующей стимуляции дыхания в 1,75 раза. Абсолютная величина стимуляции дыхания NADH (ΔJ_N) составляет лишь 3,5% от аналогичной величины разрушенных митохондрий (табл. 1). Как уже отмечалось выше, NADH не способен транспортироваться через внутреннюю мембрану интактных митохондрий [1]. Следовательно, внесение NADH к интактным митохондриям не сопровождается стимуляцией дыхания. Очевидно, что фракция митохондрий помимо интактных содержит небольшое количество разрушенных органелл способных окислять добавленный NADH. Такое количество митохондрий составляет лишь около 3,5%, если принять, что путем замораживания/оттаивания достигается разрушение 100% митохондрий. Как видно из табл. 1, ПК, ГДК и ТДК в указанных концентрациях увеличивают ΔJ_N на 10%, 35% и 33% соответственно. В абсолютных величинах – 0,34, 1,24 и 1,15 нмоль O_2/мин на 1 мг белка

соответственно. Следовательно, жирные кислоты в указанных концентрациях обладают слабым разрушающим действием по отношению к внутренней мембране митохондрий. Очевидно, что такое слабое действие жирных кислот не может быть причиной стимуляции дыхания интактных митохондрий, окисляющих сукцинат.

Табл. 1. Окисление НАДН митохондриями печени: А) разрушенными митохондриями и Б) интактными митохондриями в отсутствие и присутствии жирных кислот: пальмитиновой кислоты (ПК), ГДК и ТДК.

Условия опыта	Скорость дыхания, (нмоль O_2/мин на 1 мг белка)			ΔJ_N (%)
	Без НАДН (J_0)	НАДН 0,5 мМ (J_N)	ΔJ_N	
А. Разрушенные митохондрии				
Без добавок (n = 8)	<1	101,1 ± 4,10	101,1 ± 4,10	100
ПК 50 мкМ (n = 4)	<1	90,6 ± 5,7	90,6 ± 5,7	89,6
ГДК 150 мкМ (n = 4)	<1	98,4 ± 3,1	98,4 ± 3,1	97,3
Б. Интактные митохондрии				
Без добавок (n = 6)	4,68 ± 0,23	8,19 ± 0,40	3,51 ± 0,26	3,47
ПК 50 мкМ (n = 5)	5,06 ± 0,25	8,91 ± 0,47	3,85 ± 0,32	3,81
ГДК 150 мкМ (n = 5)	4,95 ± 0,26	9,70 ± 0,32*	4,75 ± 0,19*	4,70
ТДК 600 мкМ (n = 5)	5,18 ± 0,23	9,84 ± 0,33*	4,66 ± 0,20*	4,61

Примечание. Условия опыта и состав сред инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. * Различие между опытом (присутствие жирных кислот) и контролем (Без добавок) статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Как известно, стимуляция дыхания митохондрий печени окисляющих сукцинат α,ω-дикарбоновыми кислотами почти полностью подавляется циклоспорином А (ЦсА) в необычной для него высокой концентрации 10 мкМ [8]. При этих условиях стимуляция дыхания ПК подавляется ЦсА лишь частично [8]. На рис. 1 приведены данные изучения влияния ПК на дыхание митохондрий печени в отсутствии и присутствии ТДК и ЦсА. Как видно из рис. 1, зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации ПК линейна как в отсутствии, так и в присутствии 0,4 мМ ТДК и 10 мкМ ЦсА. При этом ЦсА частично ингибирует стимулированное ПК дыхание. ТДК стимулирует дыхание

митохондрий, однако его эффект снижается по мере увеличения концентрации ПК (рис. 1). Так если в отсутствие ПК ТДК увеличивает скорость дыхания на 7,6 нмоль O_2/мин на 1 мг белка, то в присутствии 40 мкМ ПК – на 2,0 нмоль O_2/мин на 1 мг белка. В отсутствие ПК ЦсА полностью устраняет стимулирующие действие ТДК и на туже величину снижает скорость дыхания в присутствии ПК.

Для характеристики разобщающей активности ПК использована величина удельной активности как в работе [9]. Эта величина составляет 0,471 ± 0,023 мкМ O_2/мин на 1 мкМ ПК и снижается под влиянием ТДК и ЦсА до 0,358 ± 0,019 и 0,346 ± 0,017 мкМ O_2/мин на 1 мкМ ПК соответственно. В присутствии одновременно ТДК и ЦсА удельная активность ПК составляет 0,352 ± 0,021 мкМ O_2/мин на 1 мкМ ПК. Следовательно, эффекты ТДК и ЦсА не аддитивны.

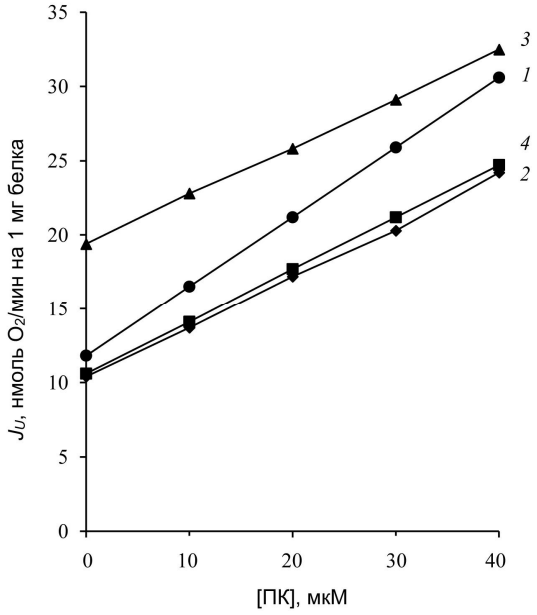


Рис. 1. Зависимость скорости дыхания митохондрий печени от концентрации пальмитиновой кислоты (ПК) в отсутствии (*1*) и в присутствии: 10 мкМ ЦсА (*2*); 0,4 мМ ТДК (*3*); 0,4 мМ ТДК + 10 мкМ ЦсА (*4*).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ТДК в указанной концентрации полностью устраняет ЦсА-чувствительную составляющую разобщающей активности ПК. В свою очередь ПК ослабляет десопрягающее действие ТДК. Выше уже отмечалось, что десопрягающее действие ТДК и ГДК обусловлено переключением комплекса III (bc_1-комплекс) дыхательной цепи на холостой режим работы, при котором транспорт электронов не сопряжен с переносом протонов из матрикса в межмембранное пространство [4]. Можно предположить, что ЦсА-чувствительная составляющая разобщающей активности ПК также осуществляется по аналогичному механизму.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 25-24-00030).

ЛИТЕРАТУРА

1. Skulachev VP, Bogachev AV, Kasparinsky FO. *Principles of Bioenergetics*. Berlin: Springer-Verlag; 2013.
2. Mookerjee SA, Divakaruni AS, Jastroch M, Brand MD. Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(7-8):463-472.
3. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1363(2):100-124.
4. Samartsev VN, Semenova AA, Belosludtsev KN, Dubinin MV. Modulators reducing the efficiency of oxidative ATP synthesis in mitochondria: protonophore uncouplers, cyclic redox agents, and decouplers. *Biophys Rev*. 2023;15(5):851-857.
5. Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1339(2):251-257.
6. Wanders RJ, Komen J, Kemp S. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J*. 2011;278(2):182-194.
7. Chien LF, Brand MD. The effect of chloroform on mitochondrial energy transduction. *Biochem J*. 1996;320(Pt 3):837-845.
8. Samartsev VN, Semenova AA, Dubinin MV. A comparative study of the action of protonophore uncouplers and decoupling agents as inducers of free respiration in mitochondria in states 3 and 4: theoretical and experimental approaches. *Cell Biochem Biophys*. 2020;78(2):203-216.
9. Адакеева СИ, Дубинин МВ, Самарцев ВН. Малонат как ингибитор индуцированного жирными кислотами циклоспорин А-чувствительного кальций-независимого свободного окисления в митохондриях печени. *Биол. мембраны*. 2015;32(1):41-51.

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ЛАКТАТА И ГЛУТАМИНА В УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК К ИШЕМИИ, ГИПОКСИИ И НЕДОСТАТКУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Плотников Е.Ю.[1], Туровский Е.А.[2], Андрианова Н.В.[1], Бабенко В.А.[1], Буян М.И.[1,3], Черкесова К.С.[1,4], Брезгунова А.А.[1], Варламова Е.Г.[2], Зорова Л.Д.[1], Певзнер И.Б.[1], Зоров Д.Б.[1]

[1]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Институт биофизики клетки Российской академии наук ФГБУН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия
[3]Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4]Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Ишемические повреждения тканей, возникающие вследствие нарушения кровоснабжения и дефицита кислорода и питательных веществ, представляют собой одну из ключевых проблем современной медицины. Наиболее известными проявлениями ишемии являются инфаркт миокарда и ишемический инсульт, однако схожие метаболические нарушения наблюдаются и при других патологических состояниях, включая геморрагический шок, травматические повреждения, сепсис и перинатальную гипоксию. В основе ишемии лежит резкое снижение доступности кислорода и энергетических субстратов, что приводит к нарушению окислительного фосфорилирования, накоплению токсичных метаболитов и критическому дефициту АТФ. Особенно уязвимы к ишемии органы, клетки которых потребляют большое количество энергетических субстратов, в частности, мозг, где даже кратковременное прекращение кровотока может вызвать необратимые повреждения нейронов и глии.

Одним из центральных звеньев патогенеза ишемии является дисфункция митохондрий, сопровождающаяся подавлением цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), накоплением активных форм кислорода (АФК) и нарушением кальциевого гомеостаза. В условиях энергетического дефицита клетки вынуждены переключаться на анаэробный гликолиз, что приводит к накоплению лактата и развитию ацидоза. Традиционно лактат рассматривался как нежелательный побочный продукт метаболизма, однако в последние годы накоплены

данные, свидетельствующие о его важной роли в качестве альтернативного энергетического субстрата для нейронов и астроцитов. В рамках концепции «астроцит-нейронального лактатного челночного механизма» предполагается, что лактат, продуцируемый астроцитами, может использоваться нейронами для поддержания энергетического баланса в условиях гипоксии. Помимо лактата, другие метаболиты, такие как глутамин, сукцинат и фумарат, также могут участвовать в адаптации клеток к ишемии, обеспечивая функционирование дыхательной цепи и ЦТК, модулируя активность митохондриальных ферментов и снижая окислительный стресс.

Несмотря на значительный прогресс в изучении метаболических нарушений при ишемии, многие вопросы остаются нерешенными. В данной работе мы сосредоточились на изучении нейропротекторных эффектов лактата, глутамина, сукцината и фумарата в условиях кислородно-глюкозной депривации (КГД) – классической модели ишемии *in vitro*. Особое внимание было уделено сравнению реакций разных типов клеток (нейронов, астроцитов, клеток почек и печени, эндотелия сосудов), что позволяет оценить универсальность выявленных механизмов защиты.

Материалы и методы. Исследование проводилось на пяти типах клеток: первичных культурах нейронов и астроцитов головного мозга крысят, а также перевиваемых линиях эпителиальных клеток почки (NRK-52E), клеток печени (LX-2) и эндотелия сосудов (EA.hy926). Для моделирования ишемии использовалась КГД, при которой клетки инкубировались в растворе Хенкса без глюкозы и кислорода в течение 40 минут. Кроме того, исследованы депривации по питательным субстратам и сыворотке без создания гипоксических условий.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали окрашивание пропидий йодидом (PI) и MTT-тест. Анализ энергетического метаболизма проводился с помощью оценки трансмембранного потенциала митохондрий зондом TMRE и измерения скорости потребления кислорода (OCR) и внеклеточного закисления (ECAR) с использованием анализатора Seahorse XFp Analyzer. Также проводилось измерение внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) с использованием флуоресцентного зонда Fura-2 и флуоресцентной микроскопии. Экспрессия генов апоптотических и провоспалительных белков оценивалась с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты.

1. Влияние глюкозы, глутамина и лактата на гибель астроцитов и нейронов при кислородно-глюкозной депривации. В нормоксии гибель астроцитов в среде, содержащей глюкозу и глутамин, не превышала 10%. Однако в условиях, когда энергетическим субстратом служил только

глутамин, уровень некроза возрастал до 23%. После 40 минут КГД гибель астроцитов в среде с глюкозой и глутамином составила 43±12%, тогда как при наличии только глутамина погибало 89±11% клеток. Это указывает на возможность использования глутамина в качестве субстрата энергетического метаболизма, однако более эффективным источником в условиях гипоксии являлась глюкоза.

Добавление 10 мМ лактата к среде с глюкозой за 24 часа до КГД снижало гибель нейронов и астроцитов при ишемии. После 40 минут КГД количество PI-положительных клеток в культуре нейронов коры головного мозга составляло более 80% в условиях прединкубации в стандартной среде с глюкозой, тогда как при добавлении лактата уровень гибели снижался до менее чем 20%. Аналогично, гибель астроцитов при добавлении в среду лактата снижалась с 40% до 10%.

2. Влияние глюкозы, глутамина и лактата на экспрессию различных генов в астроцитах и/или нейронах в норме и при кислородно-глюкозной депривации. Экспрессия генов апоптотических и про-воспалительных белков также зависела от наличия в среде различных субстратов метаболизма. В астроцитах, инкубировавшихся с глюкозой и глутамином, после КГД наблюдалось повышение экспрессии RIPK1 и Cas-3, а также антиапоптотического белка Bcl-xL. В среде с глутамином экспрессия RIPK1 и Cas-3 была выше, а Bcl-xL существенно снижалась, что указывает на большую склонность к апоптозу и воспалению.

Лактат снижал в нейрональных клетках экспрессию MLKL, Tnfα и IL-1β через 24 часа после КГД с последующей реоксигенацией, одновременно повышая уровни IL-10 и Bcl-xL. В астроцитах после инкубации с лактатом наблюдалось снижение экспрессии ключевых белков некроптоза и воспаления, включая MLKL и NF-κB, а также уменьшение экспрессии Cas-1 и IL-1β.

3. Влияние глюкозы, глутамина и лактата на кальциевую сигнализацию в астроцитах и нейронах при кислородно-глюкозной депривации. Исследования изменений Ca^{2+}-ответов показали, что при наличии глюкозы и глутамина астроциты демонстрировали двухфазные Ca^{2+}-сигналы с лаг-фазой 8±5 минут. В условиях наличия только глутамина лаг-фаза сокращалась до 2-3 минут, а конечное повышение $[Ca^{2+}]_i$ было более значительным. Это свидетельствует о более высокой чувствительности к КГД-индуцированным кальциевым осцилляциям при отсутствии глюкозы.

Добавление лактата к среде с глюкозой за 24 часа до КГД также оказывало влияние на кальциевый сигналинг. Лактат снижал глобальное повышение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах и подавлял обе фазы увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах. Это подчеркивает роль лактата в снижении метаболического стресса и ослаблении патологических кальциевых осцилляций и кальциевой перегрузки.

4. Влияние глюкозы, глутамина и лактата на энергетический метаболизм и митохондрии. Для характеристики изменений дыхания и гликолиза в культурах астроцитов и нейронов были оценены биоэнергетические показатели OCR и ECAR. Добавление глутамина вызывало увеличение ECAR, указывая на активацию гликолиза, а также повышение OCR, что свидетельствует о включении глутамина в окислительное фосфорилирование. Глюкоза, напротив, способствовала преимущественно гликолизу, подавляя окислительное фосфорилирование. При совместном использовании глюкозы и глутамина наблюдалась наибольшая эффективность энергетического метаболизма.

Добавление лактата к среде с глюкозой и глутамином вызывало снижение ECAR и увеличение OCR в астроцитах, что указывает на сдвиг метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования и ингибирование гликолиза. Аналогично, в нейронах лактат оказывал угнетающее влияние на гликолиз, но не влиял на OCR. Это свидетельствует о модулирующей роли лактата в энергетическом метаболизме.

5. Влияние метаболитов цикла трикарбоновых кислот на жизнеспособность клеток различных тканей при субстратной депривации. Было показано, что недостаток разных метаболических субстратов приводит к гибели исследуемых клеток, что делает такую модель удобным способом изучения ишемии и других состояний, связанных с недостатком кровоснабжения, таких как гиповолемия или геморрагический шок, в условиях *in vitro*. Добавление сукцината, как в нормальных условиях, так и при депривации повышало жизнеспособность клеток, прежде всего мозга и почек, более чем в 2 раза. Применение фумарата также повышало жизнеспособность клеток, но менее эффективно. Анализ митохондриального потенциала с помощью конфокальной микроскопии после окраски зондом TMRE показал, что в нормальных условиях инкубация астроцитов и клеток печени с сукцинатом повышала трансмембранный потенциал митохондрий. Тогда как при депривации по сыворотке в астроцитах наблюдалось аналогичное повышение потенциала митохондрий, а в клетках LX-2 не влияла на него. Похожие изменения наблюдались и в клетках почечного эпителия NRK-52e. Это указывает на роль метаболитов в поддержании функции митохондрий и энергетического статуса клеток в условиях недостатка питательных веществ или ростовых факторов.

Таким образом, применение метаболитов цикла трикарбоновых кислот существенным образом влияет на жизнеспособность клеток жизненно важных органов как в норме, так и в модели геморрагического шока, что может реализоваться через восстановление энергетического статуса клеток и поддержание функционирования их митохондрий.

Обсуждение. Полученные результаты демонстрируют ключевую роль не только классического энергетического субстрата, глюкозы, но и компонентов цикла Кребса, а также глутамина и лактата в поддержании жизнеспособности и функционирования астроцитов и нейронов при кислородно-глюкозной депривации. Глюкоза показала себя как ключевой субстрат, способствующий снижению некроза и апоптоза, а также ослаблению кальциевых осцилляций. Эти данные согласуются с результатами многочисленных исследований, которые доказывают, что глюкоза является основным источником энергии для мозга и необходима для поддержания ионного гомеостаза и функции митохондрий [1].

Глутамин, хотя и показал возможность включения в гликолиз и дыхание в качестве энергетического субстрата, не обеспечивал достаточной защиты и поддержания жизнеспособности клеток мозга. Интересно, что исследования, продемонстрировавшие окисление глутамина в митохондриях, также выявили, что его включение в метаболизм может быть недостаточным для поддержания энергетического статуса клеток при гипоксии [2].

Лактат, как показали наши исследования, выполняет не только энергетическую, но и сигнальную функцию, снижая экспрессию проапоптотических и провоспалительных генов. Ранее способность лактата регулировать нейрональную активность и воспаление была подтверждена на моделях переживающих срезов мозга [3] и кислородно-глюкозной депривации в культуре [4].

Кроме того, мы выявили, что метаболиты цикла трикарбоновых кислот, такие как сукцинат и фумарат, могут играть важную роль в поддержании жизнеспособности клеток в условиях ишемии или депривации по метаболическим субстратам, а также ростовым факторам. Сукцинат, в частности, показал высокую эффективность в восстановлении энергетического статуса клеток, что может быть связано с его способностью поддерживать функционирование дыхательной цепи митохондрий.

Глюкоза и глутамин, как основные энергетические субстраты, также оказывают значительное влияние на выживаемость клеток, особенно в условиях гипоксии. Глутамин может служить альтернативным источником энергии, поддерживая окислительное фосфорилирование и гликолиз. Однако комбинация глюкозы и глутамина оказалась более эффективной в предотвращении гибели клеток, что подчеркивает важность комплексного подхода к восстановлению энергетического баланса.

Полученные данные расширяют понимание роли метаболитов ЦТК и альтернативных энергетических субстратов в адаптации клеток к ишемии, а также открывают новые перспективы для разработки

метаболических терапевтических стратегий, направленных на защиту клеток мозга и других жизненно важных органов при ишемии, травмах и геморрагическом шоке. Дальнейшие исследования должны быть ориентированы на изучение механизмов, лежащих в основе этих эффектов, и разработку методов их клинического применения.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 24-75-10013 (исследование фумарата и сукцината) и № 21-75-30009 (исследование лактата).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang S, Lachance BB, Mattson MP, Jia X. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. Prog Neurobiol. 2021;204:102089.
2. Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, Boobis LH, Williams C, Bowtell JL. Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(4):E669-E675.
3. Karagiannis A, Gallopin T, Lacroix A, Plaisier F, Piquet J, Geoffroy H, Hepp R, Naudé J, Le Gac B, Egger R, Lambolez B, Li D, Rossier J, Staiger JF, Imamura H, Seino S, Roeper J, Cauli B. Lactate is an energy substrate for rodent cortical neurons and enhances their firing activity. eLife. 2021;10:e71424.
4. Xu J, Ji T, Li G, et al. Lactate attenuates astrocytic inflammation by inhibiting ubiquitination and degradation of NDRG2 under oxygen-glucose deprivation conditions. J Neuroinflammation. 2022;19:314.

FLIM МИКРОСКОПИЯ FAD В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Попов Д.Ю.[1], Горюнов И.А.[1], Кандурова К.Ю.[1], Потапова Е.В.[1], Дремин В.В.[1], Винокуров А.Ю.[1], Абрамов А.Ю.[2]

[1]Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедициной фотоники ОГУ им. И.С. Тургенева, Орел, Россия
[2]UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

Введение. Контроль состояния ключевых коферментов является широко распространенным и комплексным инструментом оценки метаболизма. С момента открытия автофлуоресценции основных коферментов – восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) (NAD(P)H) и флавинов (окисленных флавинадениндинуклеотида (FAD) и флавиномононуклеотида (FMN)), они стали одними из основных маркеров митохондриального метаболизма [1,2], которые, однако, используются лишь для интегральной оценки, т.е. не дают возможности выявить нарушения в работе отдельных структурных элементов митохондрий. На наш взгляд, такая тонкая оценка может быть реализована на основе анализа флуоресценции флавинов, которые, в отличие от NADH, остаюся в структуре соответствующих белков в ходе как окисления, так и восстановления, что снижает вариативность сигнала ввиду малого изменения концентраций “свободной” и “связанной” с белком форм. В частности, это может иметь большое значение ввиду того, что изменение активности различных флавопротеинов может приводить к ряду патологий [4].

Несмотря на многочисленные попытки создать *in vivo* метод исследования энергетического метаболизма на основе измерения автофлуоресценции, все еще возникают некоторые трудности из-за того что, флавопротеины участвуют во многих процессах в клетках. Только в тканях человека насчитывается около 80 различных флавопротеинов [3,4], и разделение их сигналов представляется сложной задачей. Примером ее решения *in vitro* может служить использование активаторов или ингибиторов дыхания, которое помогает выделить митохондриальный сигнал флавинов [5]. Основная проблема даже такого подхода в том, что вне зависимости от структуры белков, входящие в их состав флавины имеют одинаковые спектральные характеристики, а значит не могут быть отличены друга от друга. Эту сложность можно преодолеть за счет применения микроскопии времени жизни флуоресценции, что было нами использована для анализа функционального состояния белков дыхательной цепи митохондрий.

Материалы и методы. Интактные митохондрии выделяли из печени крыс Вистар (150-200 г) по методике [6]. Экспериментальные процедуры были одобрены локальным этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол № 2 от 06.12.2024) в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Измерения времени жизни флавопротеинов проводили с использованием системы на основе инвертированного микроскопа Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония). В качестве источника возбуждения применялся лазер LaserNest® 445-500 (Omicron, Германия), излучающий на длине волны 445 нм. Источник излучения работает в режиме высокочастотной модуляции 40 МГц, что позволяет проводить измерения в частотной области (frequency-domain FLIM). Для регистрации флуоресцентного сигнала использовалась камера pco.flim (PCO AG, Германия), синхронизированная с источником возбуждения. Полученные данные обрабатывались методом частотного FLIM, который основан на регистрации фазового сдвига и демодуляции флуоресцентного сигнала относительно возбуждающего излучения.

Для измерения $\Delta\Psi m$ изолированные митохондрии инкубировали в 10 мкМ растворе Rhodamine123 (Invitrogen, США) при температуре около 0°C в темноте в течение 30 мин. Измерения проводили на флуоресцентном ридере FLUOstar Omega (BMG Labtech, Германия) с использованием возбуждающего излучения 485-12 нм и регистрацией сигнала после длиннопропускающего фильтра 520 нм. Все эксперименты с активными митохондриями проводили при 25 °C. Митохондрии добавляли в концентрации 0,5 мг/мл в пересчете на белок.

Исследование скорости дыхания митохондрий проводили с использованием респирометра Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания). В качестве среды для измерения использовали полную среду по Панову [7] с добавлением субстратов комплекса I глутамат+малат или II сукцинат+ротенон (Sigma Aldrich, США). В ходе изучения выполняли анализ базовой скорости потребления кислорода, а также скорости после внесения ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А 2 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) и рассчитывали дыхательный контроль.

Результаты. В экспериментах по оценке времени жизни флуоресценции оценивались базовые значения времени жизни в разные моменты времени. Однозначной тенденции изменения интенсивности флуоресценции не наблюдается. Было выявлено, что в процессе инкубации параметр фазового времени жизни, являющийся суперпозицией времен жизней отдельных флуорофоров, увеличивается, что свидетельствует о динамических изменениях в пуле флавопротеинов митохондрий и их микроокружении (рис. 1). Это явление может быть обусловлено несколькими факторами – снижением вклада короткой

компоненты в общий сигнал автофлуоресценции или увеличение вклада долгоживущей компоненты. По литературным данным известно, что FMN комплекса I имеет более долгое время жизни (4.2 нс), по сравнению с FAD комплексом II (2.9 нс) [11].

Активность изолированных митохондрий со временем снижается из-за структурного и функционального разрушения. Свежевыделенные митохондрии демонстрируют оптимальные показатели окислительного фосфорилирования (OXPHOS) и митохондриального мембранного потенциала (ΔΨm), поддерживаемые неповрежденными комплексами электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) [8]. Однако уже через некоторое время наступает прогрессирующая дисфункция, выражающаяся в снижении синтеза АТФ, увеличении продукции активных форм кислорода (АФК) и снижении дыхательного контроля [9]. Разрушение митохондрий усугубляется открытием переходной поры проницаемости мембраны (mPTP), что приводит к высвобождению цитохрома с и разобщению митохондриального дыхания [10].

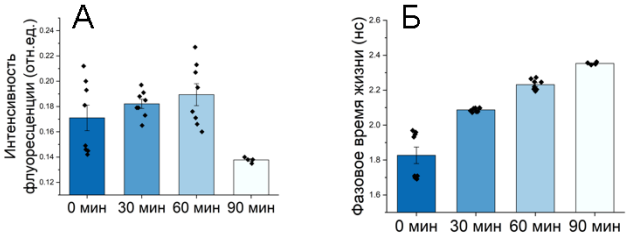


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции ФАД (А) и фазового времени жизни (Б).

Проведенные эксперименты по оценке механизма поддержания митохондриального мембранного потенциала демонстрируют увеличение амплитуды ответа на ротенон (ингибитор комплекса I), т.е. со временем, вклад комплекса I в поддержании ΔΨm увеличивается (рис. 2В). Однако, не наблюдается изменений в характере и амплитудах ответов на субстрат комплекса II. При этом стоит отметить, что со временем происходит снижение общей величины ΔΨm (рис. 2Б).

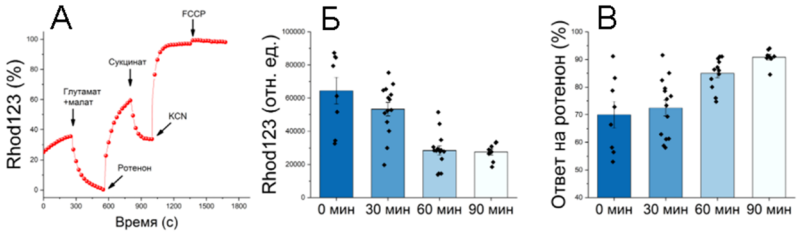


Рис. 2. Результаты оценки способности митохондрий к поддержанию ΔΨm. Репрезентативная кривая оценки вклада комплексов ЭТЦ в поддержание ΔΨm (А); результаты оценки изменения ΔΨm (Б) и относительной амплитуды деполяризации митохондрий в ответ ротенон (В) со временем.

Последнее может быть связано с тем, что активность изолированных митохондрий со временем снижается из-за структурного и функционального разрушения. Свежевыделенные митохондрии демонстрируют оптимальные показатели окислительного фосфорилирования (OXPHOS) и ΔΨm, поддерживаемые неповрежденными комплексами электронтранспортной цепи (ЭТЦ) [8]. Однако уже через некоторое время наступает прогрессирующая дисфункция, выражающаяся в снижении синтеза АТФ, увеличении продукции активных форм кислорода и снижении дыхательного контроля [9]. Разрушение митохондрий усугубляется открытием переходной поры проницаемости мембраны, что приводит к высвобождению цитохрома с и разобщению митохондриального дыхания [10].

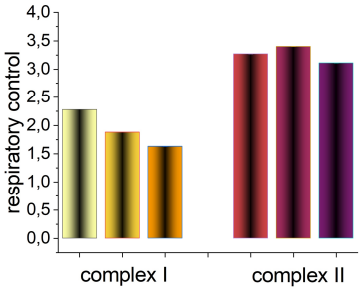


Рис. 3. Снижение дыхательного контроля на среде с субстратами комплекса I (глутамат+малат) и стабильность дыхания на субстрате комплекса II (сукцинат+ротенон).

Дополнительные эксперименты по оценке митохондриального дыхания показывают снижение величины дыхательного контроля на среде с субстратами комплекса I (глутамат+малат), но не комплекса II (рис. 3). Это может свидетельствовать о том, что увеличение активности комплекса I не связано с образованием АТФ.

Проведенные эксперименты в совокупности дают некоторое расширенное представление о функциональности дыхательной цепи митохондрий и ее изменении со временем, а также показывают перспективу применения технологии FLIM для контроля этих изменений. Наблюдаемое снижение дыхательного контроля на субстратах комплекса I в митохондриях предположительно происходит из-за изменения функции данного белка.

Беря во внимание вышеописанное, можно интерпретировать полученные результаты по измерению времени жизни следующим образом – увеличение среднего времени жизни происходит за счет роста вклада комплекса I. Таким образом, частотный подход к оценке времени жизни позволяет оценивать тонкие процессы деградации митохондриальной мембраны и отдельных комплексов ЭТЦ без использования ингибиторного анализа.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2025-011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abir AH, Weckwerth L, Wilhelm A, et al. Metabolic profiling of single cells by exploiting NADH and FAD fluorescence via flow cytometry. *Mol Metab*. 2024;87:101981.
2. Kolenc OI, Quinn KP. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(6):875-889.
3. Macheroux P, Kappes B, Ealick SE. Flavogenomics--a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS J*. 2011;278(15):2625-2634.
4. Lienhart WD, Gudipati V, Macheroux P. The human flavoproteome. *Arch Biochem Biophys*. 2013;535(2):150-162.
5. Bartolome F, Abramov A. Measurement of Mitochondrial NADH and FAD Autofluorescence in Live Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2015;1264:263-270.
6. Ikromova FR, Khasanov FA, Saidova MJ, et al. Acute CCl4-induced intoxication reduces complex I, but not complex II-based mitochondrial bioenergetics – protective role of succinate. *J Bioenerg Biomembr*. 2025;57(1):11-26.
7. Панов АВ. *Практическая Функциональная Митохондриология. Становление Новых Парадигм*. Новосибирск: СО РАН; 2023.
8. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1235-1246.

9. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*. 2008;3(6):965-976.
10. Baev AY, Vinokurov AY, Novikova IN, Dremin VV, Potapova EV, Abramov AY. Interaction of Mitochondrial Calcium and ROS in Neurodegeneration. *Cells*. 2022;11(4):706.
11. Koziol B, Markowicz M, Kruk J, Plytycz B. Riboflavin as a Source of Autofluorescence in *Eisenia fetida* Coelomocytes. *Photochem Photobiol*. 2006;82(2):570-573.

СИГНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВВЕДЕНИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКА АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТА В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫС НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ РАЗГРУЗКИ

Сидоренко Д.А., Боков Р.О., Галкин Г.В., Львова И.Д., Кулишенко А.А., Шарло К.А., Шенкман Б.С.

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Введение. Снижение нагрузки на скелетные мышцы (механическая разгрузка) приводит к изменению метаболизма и паттерна экспрессии генов мышечных волокон. В мышечных волокнах «медленного» типа, в норме обладающих окислительным метаболизмом и экспрессирующих устойчивую к утомлению «медленную» изоформу миозина, происходит снижение экспрессии генов-активаторов биогенеза митохондрий и возрастает экспрессия «быстрых» миозиновых изоформ [1]. Это изменение паттерна экспрессии генов приводит к трансформации мышечных волокон из «медленного» типа в «быстрый», что ведет к снижению устойчивости мышц к утомлению. Молекулярные механизмы, лежащие в основе изменения генной экспрессии при функциональной разгрузке, остаются слабо изученными. Тем не менее, в ряде исследований было показано, что на фоне механической разгрузки мышц снижение экспрессии генов, участвующих в реализации «медленного» окислительного фенотипа мышечных волокон, сопровождается увеличением уровня CpG-метилирования промоторных участков данных генов [2]. Этот факт позволяет предполагать, что существует некий регуляторный механизм, осуществляющий CpG-метилирование промоторов генов-регуляторов фенотипа мышечного волокна в зависимости от наличия мышечной нагрузки.

Мы предположили, что уровень CpG-метилирования ряда генов-регуляторов фенотипа мышечного волокна в условиях механической разгрузки мышцы может определяться недостатком альфа-кетоглутарата, являющегося интермедиатом цикла Кребса и одновременно ключевым кофактором деметилаз TET. Ранее было показано снижение содержания альфа-кетоглутарата в мышцах при их механической разгрузке [3].

Методы. Для проверки этой гипотезы самцы крыс Вистар возрастом 1,5-2 месяца и весом 150-180 граммов были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: виварный контроль (C), группа 7-суточного вывешивания задних конечностей с введением плацебо (7HS) и группа 7-суточного вывешивания задних конечностей с ежедневным внутрибрюшинным введением диметил-2-оксоглутарата (200 мг/кг) (7HSD). Диметил-2-оксоглутарат является предшественником альфа-кетоглутарата, способным проникать через клеточную мембрану [4]. Методика вывешивания задних конечностей крыс по Ильину-Новикову в

модификации Морей-Холтон проводилась, как описано ранее [5]. Данная методика является широко используемой для воссоздания условий функциональной разгрузки мышц задних конечностей грызунов. После завершения эксперимента у животных под авертиновым наркозом извлекали камбаловидные мышцы, которые немедленно замораживали в жидком азоте, после чего крыс эвтаназировали. Полученный биоматериал использовали для анализа уровня экспрессии генов-регуляторов биогенеза митохондрий, содержания митохондриальной ДНК и белков, а также для иммуногистохимического анализа площади поперечного сечения (ППС) волокон «быстрых» и «медленного» типов на поперечных криосрезах мышц.

Результаты и обсуждение. После 7-суточного вывешивания задних конечностей крыс в группе 7HS произошло достоверное снижение содержания мРНК регулятора биогенеза митохондрий PGC1α, а также мРНК субъединиц IV комплекса дыхательной цепи COX I, COX II и COX IV, наряду со снижением содержания COXI в тотальной белковой фракции в сравнении с группой С. Также в группе 7HS наблюдалось снижение экспрессии мРНК медленной изоформы миозина *myh7* и рост экспрессии быстрых изоформ миозинов *myh1* и *myh4.* Эти результаты хорошо согласуются с литературой, описывающей изменения, характерные для данной продолжительности функциональной разгрузки [6,7]. Содержание митохондриальной ДНК в группе 7HS также было снижено в сравнении с группой С. При этом в группе 7HSD экспрессия мРНК перечисленных маркеров биогенеза митохондрий не имела достоверных отличий от группы С, за исключением содержания COXI, которое было достоверно выше контрольных значений. Уровень экспрессии медленной изоформы миозина в группе 7HSD не отличался от группы 7HS и был достоверно ниже значений контроля, в то время как уровень экспрессии «быстрых» изоформ миозина в группе 7HSD не имел достоверных отличий ни от группы С, ни от группы 7HS. Иммуногистохимический анализ показал снижение ППС как «медленных», так и «быстрых» мышечных волокон в обеих вывешенных группах (7HS и 7HSD) в сравнении с группой С. Отдельно следует отметить эффект введения диметил-2-кетоглутарата на уровень фосфорилирования АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК), одного из основных регуляторов биогенеза митохондрий в скелетных мышцах: этот параметр не различался между группами С и 7HS, однако был значительно повышен в сравнении с обеими этими группами в группе 7HSD. Таким образом, эффекты введения 2-метил-кетоглутарата на экспрессию маркеров биогенеза митохондрий и «быстрых» изоформ миозина могут быть связаны как с эпигенетическими механизмами, так и с опосредованным введением препарата ростом уровня фосфорилирования АМПК.

Работа поддержана грантом РНФ 23-75-10048.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shenkman, B. S. (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals, International journal of molecular sciences, 21, doi: 10.3390/ijms21145037.
2. Tomiga, Y., Ito, A., Sudo, M., Ando, S., Eshima, H., Sakai, K., Nakashima, S., Uehara, Y., Tanaka, H., Soejima, H., and Higaki, Y. (2019) One week, but not 12 hours, of cast immobilization alters promotor DNA methylation patterns in the nNOS gene in mouse skeletal muscle, The Journal of physiology, 597, 5145-5159, doi: 10.1113/JP277019.
3. Zhang, X., Trevino, M. B., Wang, M., Gardell, S. J., Ayala, J. E., Han, X., Kelly, D. P., Goodpaster, B. H., Vega, R. B., and Coen, P. M. (2018) Impaired Mitochondrial Energetics Characterize Poor Early Recovery of Muscle Mass Following Hind Limb Unloading in Old Mice, The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 73, 1313-1322, doi: 10.1093/gerona/gly051.
4. Hou, P., Kuo, C. Y., Cheng, C. T., Liou, J. P., Ann, D. K., and Chen, Q. (2014) Intermediary metabolite precursor dimethyl-2-ketoglutarate stabilizes hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibiting prolyl-4-hydroxylase PHD2, PloS one, 9, e113865, doi: 10.1371/journal.pone.0113865.
5. Morey-Holton, E., Globus, R. K., Kaplansky, A., and Durnova, G. (2005) The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data, Adv Space Biol Med, 10, 7-40, doi: 10.1016/s1569-2574(05)10002-1.
6. Lomonosova, Y. N., Turtikova, O. V., and Shenkman, B. S. (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway, Journal of muscle research and cell motility, 37, 7-16, doi: 10.1007/s10974-015-9428-y.
7. Sharlo, K., Lvova, I., Turtikova, O., Tyganov, S., Kalashnikov, V., and Shenkman, B. (2022) Plantar stimulation prevents the decrease in fatigue resistance in rat soleus muscle under one week of hindlimb suspension, Archives of biochemistry and biophysics, 718, 109150, doi: 10.1016/j.abb.2022.109150.

ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА ФИБРОБЛАСТЫ С МУТАЦИЕЙ, СВЯЗАННОЙ С РАЗВИТИЕМ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Федотова Е.И., Крицкая К.А., Шарапов М.Г., Мальцева В.Н., Бережнов А.В.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – неизлечимое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, связанное с гибелью клеток мозга, в частности, дофаминергических нейронов в компактной области черной субстанции [1]. Помимо спорадического характера развития БП выявлены гены, которые идентифицированы как моногенные причины БП, включая *SNCA, LRRK2, PRKN (PARK2), DJ-1, PINK1, VPS35 и ATP13A2* [2]. Многие из патогенных мутаций в этих генах напрямую связаны с митохондриальной дисфункцией и клеточным окислительным стрессом (ОС), что связано с нарушением бионергетики клеток, а также с накоплением поврежденных митохондрий (МХ) [3,4]. В тоже время процесс утилизации поврежденных МХ из клетки, митофагия (МФ), может запускаться при различных стрессовых состояниях, сопровождающихся выработкой активных форм кислорода (АФК), таких как гипоксия, голодание по питательным веществам и ишемия/реперфузия [5]. В настоящее время остается без ответа вопрос, каким образом запускается и от чего зависит процесс МФ в клетках при БП, в том числе и в условиях ОС.

Известно, что природные антиоксиданты, витамины, белки и антиоксидантные сигнальные пути являются основными факторами нейтрализации АФК и их разрушительного действия при БП [6]. Таким образом, применение антиоксидантов является потенциальной стратегией терапевтического вмешательства и/или профилактики нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БП. В связи с тем что в ряде работ показано участие естественного антиоксиданта пероксиредоксина 6 Prx6 в процессах МФ [7,8], при этом их взаимосвязь остается неясной и малоизученной, представляет интерес исследование, направленное на изучение взаимосвязи между генерацией АФК при ОС, индукцией МФ и влияния на эти процессы антиоксиданта Prx6.

Целью настоящего исследования было изучение возможного защитного действия Prx6, направленного на улучшение митохондриальных функций, на клеточной наследственной модели БП (фибробластах с мутацией в гене PINK1), подвергнутых ОС.

Материалы и методы. В исследованиях были использованы человеческие фибробласты с мутацией в гене, кодирующем PINK1, а также контрольные фибробласты, полученные от условно здорового донора. В работе была оценена степень митофагии, определено количество жизнеспособных клеток, зарегистрированы уровень митохондриального потенциала и скорость АФК методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Также была применена модель окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 (обработка клеток 150 мкМ H_2O_2 в течение 2 ч).

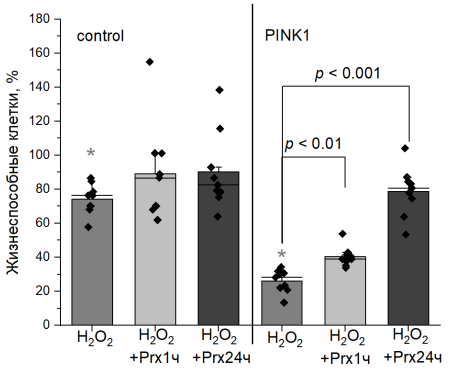


Рис. 1. Влияние Prx6 на жизнеспособность фибробластов в модели H_2O_2-индуцированного ОС. Количество жизнеспособных клеток при добавлении 150 мкМ H_2O_2 в течение 2 ч в отсутствие и в присутствии 150 мкг/мл Prx6 с прединкубацией 1 ч (H_2O_2+Prx1ч) и 24 ч (H_2O_2+Prx1ч) в контрольной культуре (conrol) и в клетках с мутацией PINK1. Клетки без воздействия (control, PINK1) взяты за 100%. * $p < 0.01$ относительно клеток без воздействий. $n = 3$.

Результаты и обсуждение. Для того чтобы выявить, способен ли экзогенно добавленный Prx6 защищать клетки от гибели, мы анализировали жизнеспособность клеток в культуре методом двойного окрашивания Hoechst 33342 и Propidium Iodide (PI). Оценивали плотность культуры фибробластов, полученных от донора с мутацией в гене, кодирующем PINK1 (клетки PINK1) и фибробластах от здорового донора (контрольные клетки), а также долю клеток, проницаемых для PI (нежизнеспособных клеток). Воздействие H_2O_2 приводило к существенному снижению как плотности, так и количеству жизнеспособных клеток в обоих типах фибробластов (рис. 1). При оценке количества за 100% была взята плотность соответствующей культуры

(control или PINK1) в контрольных условиях без воздействий. При действии H_2O_2 только 27 ± 6% клеток PINK1 оставались жизнеспособными по сравнению с контрольными клетками (74 ± 3%). Предынкубация с Prx6, добавленным в концентрации 150 мкг/мл, частично отменяла действие H_2O_2, и этот эффект был более выражен в клетках PINK1, где количество жизнеспособных клеток возрастало в 3 раза (до 78 ± 14%), что существенно выше, чем в отсутствие Prx6. Стоит отметить, что сам Prx6 не влиял на плотность исследуемых культур фибробластов.

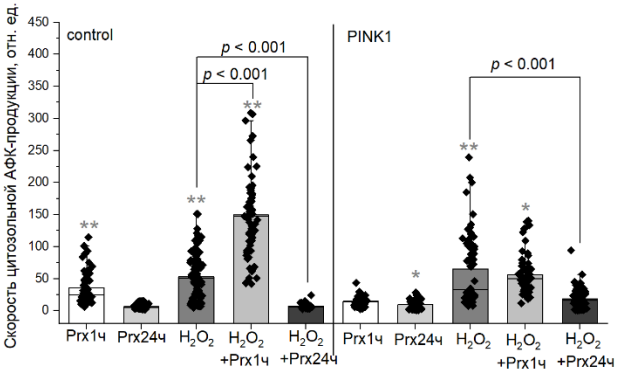


Рис. 2. Влияние Prx6 на продукцию АФК на фибробластах. Количественная оценка базальной продукции АФК и вызванной двухчасовой инкубацией с 150 мкМ H_2O_2 в отсутствие и в присутствии 150 мкг/мл Prx6 при 1 ч предынкубации (Prx1ч/Prx1ч+H_2O_2) и при 24 ч предынкубации (Prx24ч/Prx24ч+H_2O_2) в контрольной культуре (control) и клетках PINK1. Скорость образования цитозольных АФК оценивали по временной кинетике в относительных единицах от скорости АФК-продукции в контрольных фибробластах без воздействий (принято за 0). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ относительно клеток без воздействий. $n = 3$.

Известно, что при БП возникает окислительный стресс, который характеризуется нарушением баланса между производством и утилизацией АФК. Для оценки влияния Prx6 на внутриклеточный уровень АФК мы определяли скорость продукции АФК в цитозоле фибробластов с помощью регистрации флуоресцентного сигнала от селективного зонда H2DCFDA. Было показано, что клетки PINK1 характеризуются более высоким базальным уровнем продукции АФК по сравнению с контрольными фибробластами. При добавлении к клеткам H_2O_2 наблюдается значительное увеличение продукции АФК как в контрольных клетках (в 5 раз), так и клетках PINK1 (в 2 раза), что подтверждает состояние ОС в исследуемых клетках (рис. 2). В контрольных клетках Prx6

как в «базовых» условиях, так и в условиях ОС при коротком времени предынкубации (1 ч) увеличивает продукцию АФК, а длительная предынкубация (24 ч) с Prx6 практически не изменяет уровень продукции в базовых условиях, но приводит к снижению H_2O_2-индуцированной АФК-продукции до базального уровня. В клетках PINK1 предынкубация с Prx6 (1 ч и 24 ч) снижает продукцию АФК как в базовых условиях, так и в условиях ОС.

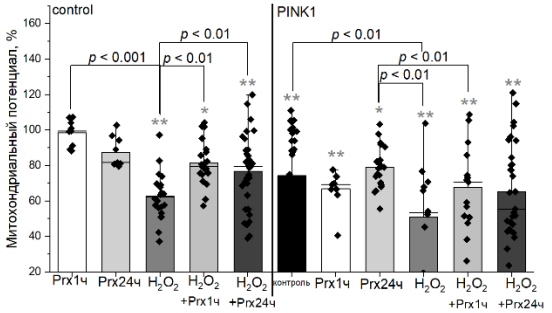


Рис. 3. Влияние Prx6 на митохондриальный мембранный потенциал в фибробластах. Количественная оценка изменения ΔΨ в базальных условиях и при двухчасовой инкубации с 150 мкМ H_2O_2 в контрольной культуре (control) и в клетках PINK1 в присутствии 15 мкг/мл Prx6 при 1 ч предынкубации (Prx1ч/Prx1ч+H_2O_2) и при 24 ч предынкубации (Prx24ч/Prx24ч+H_2O_2). За 100% была принята интенсивность флуоресценции в контрольных клетках (control) без воздействий. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ относительно клеток без воздействий. $n = 3$.

Известно, что митохондриальный мембранный потенциал (ΔΨ) является мощным регулятором продукции АФК, а также непосредственно влияет на процесс митофагии в клетках. Далее мы провели количественную оценку величины ΔΨ, оценивая флуоресцентный сигнал от клеток, покрашенных зондом TMRM, в ответ на добавку деполяризующего агента FCCP. Митохондриальный потенциал в клетках PINK1 в базальных условиях был ниже на 25%, чем в контрольных клетках (клетки PINK1 – 75 ± 21%, контрольные клетки – 100 ± 20%) (рис. 3). В условиях ОС, индуцированного H_2O_2, мы наблюдали снижение ΔΨ как в контрольных клетках, так и в клетках PINK1. Prx6 влияет не значительно на ΔΨ всех экспериментальных клеток в базовых условиях, в то время как в условиях ОС данный параметр повышается, как в контрольных фибробластах, так в клетках PINK1.

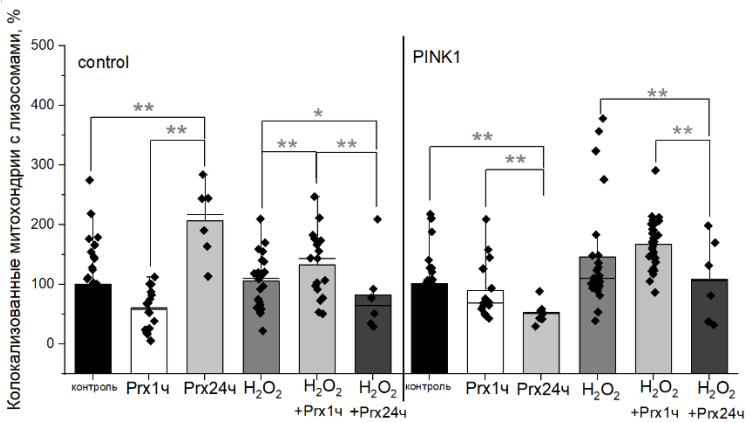


Рис. 4. Влияние Prx6 на активацию митофагии в фибробластах. Уровень колокализованных митохондрий с лизосомами в контрольных клетках (control) и клетках с мутацией PINK1 (PINK1), в отсутствие или в присутствии 150 мкМ H_2O_2 в культуральной среде, а также предынкубацией с 150 мкг/мл Prx6 в течение 1 ч (Prx1ч/Prx1ч+H_2O_2) или 24 ч (Prx24ч/Prx24ч+H_2O_2). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. $n = 3$

Известно, что нарушение митофагии наблюдается при БП. Показано, что активировать МФ могут различные факторы и механизмы, в том числе изменение ΔΨ и ОС. Уровень МФ в клетках, мы оценивали, анализируя колокализацию МХ и лизосом в клетках, нагруженных маркерами этих органелл MitotrackerGreen и LysotrackerRed. Мы показали, что при базовых условиях в клетках PINK1 уровень МФ ниже, чем в контрольных (рис. 4). Добавка H_2O_2 не влияет на уровень МФ в контрольных клетках, а в клетках PINK1 увеличивает уровень МФ до контрольных значений. Представляет интерес воздействие Prx6 на уровень МФ в контрольных фибробластах. Так, при условиях отсутствия в среде H_2O_2 предынкубация с Prx6 в течение 1 ч вызывает снижение уровня МФ, а предынкубация в течение 24 ч вызывает значительную индукцию МФ и увеличение ее уровня. В клетках PINK1 Prx6 на уровень МФ практически не влияет. Удивительно, но в условиях наличия 150 мкМ H_2O_2 наблюдается инвертирование эффектов Prx6: 1 ч предынкубация с Prx6 увеличивает уровень МФ, а 24 ч предынкубация – снижает. При наличии H_2O_2 в культуральной среде предынкубация мутантных клеток PINK1 с Prx6 вызывала увеличение уровня МФ относительно уровня митофагии этих клеток в базовых условиях, но при этом это значение не отличалось от уровня МФ клеток PINK1 в условиях ОС и соответствовало уровню МФ контрольных клеток.

Таким образом, можно сказать, что в условиях острой токсичности индуцированной добавкой H_2O_2, источником генерации высоких количеств АФК могут быть МХ, а Prx6 способен действовать и как непосредственный антиоксидант, который инактивирует АФК, и как регулятор процессов МФ, за счёт вовлечения в окислительно-восстановительные сигнальные пути, ассоциированные с ответами на ОС и контролирующие выживаемость клеток. В работе было показано, что на клетках PINK1 как в базовых условиях, так и условиях ОС, индуцированного H_2O_2, Prx6 проявляет исключительно антиоксидантное действие, увеличивая выживаемость клеток, причём усиливающуюся при удлинении времени предынкубации. В случае контрольных клеток на коротких временах предынкубации с Prx6 (1 ч) проявляются преимущественно прооксидантные свойства Prx6, а на длительных – антиоксидантные. Такие различия в действии Prx6 на мутантные и нормальные клетки могут быть связаны с общим окислительно-восстановительным состоянием клеток (клетки PINK1 изначально находятся в состоянии ОС), от чего зависит направленность проявления активности Prx6 (про- или антиоксидантная активность) и степень его вовлеченности в регуляцию редокс-сигнализации в клетке. Другим важным выводом является то, что Prx6 не проявляет прооксидантного действия в отношении клеток PINK1, а нормализует параметры клеток, связанные с их редокс-статусом, изменяя их до показателей контрольных клеток и увеличивая их жизнеспособность. В результате, мы наблюдали ингибирование уровня АФК в клетках PINK1, повышение митохондриального потенциала, увеличение МФ до адекватных уровней, когда происходит утилизация дисфункциональных МХ, что приводит к «уничтожению» источника образования АФК. Добавка Prdx6 как в базовых условиях, так и в условиях острой токсичности, оказывает защитное действие на клетки PINK1.

Таким образом, действие Prx6 носит преимущественно антиоксидантный и протекторный характер по отношению как к контрольным клеткам, так к клеточной наследственной модели БП (человеческие фибробласты с мутацией в гене PINK1), при этом Prx6 вполне можно рассматривать как возможный защитный агент при ОС, связанном с гиперпродукцией АФК, и сопутствующих нарушениях МФ.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-24-00455 https://rscf.ru/project/25-24-00455/

ЛИТЕРАТУРА

1. Moradi Vastegani S, Nasrolahi A, Ghaderi S, Belali R, Rashno M, Farzaneh M, Khoshnam SE. Mitochondrial Dysfunction and Parkinson's Disease: Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Neurochem Res.* 2023;48(8):2285–2308.
2. Bandrés-Ciga S, Ruz C, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Pelegrina J, Vives F, Duran R. Structural genomic variations and Parkinson's disease. *Minerva Med.* 2017;108(5):438-447.
3. Shen Y, Wu Q, Shi J, Zhou S. Regulation of SIRT3 on mitochondrial functions and oxidative stress in Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110928.
4. Pereira SL, Grossmann D, Delcambre S, Hermann A, Grünewald A. Novel insights into Parkin-mediated mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2023;80:102720.
5. De Gaetano A, Gibellini L, Zanini G, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M. Mitophagy and Oxidative Stress: The Role of Aging. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(5):794.
6. Hemmati-Dinarvand M, Saedi S, Valilo M, Kalantary-Charvadeh A, Alizadeh Sani M, Kargar R, Safari H, Samadi N. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neurosci Lett.* 2019;709:134296.
7. Ma S, Zhang X, Zheng L, Li Z, Zhao X, Lai W, Shen H, Lv J, Yang G, Wang Q, Ji J. Peroxiredoxin 6 Is a Crucial Factor in the Initial Step of Mitochondrial Clearance and Is Upstream of the PINK1-Parkin Pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(9):486-501.
8. Hong T, Zhou Y, Peng L, Wu X, Li Y, Li Y, Zhao Y. Knocking Down Peroxiredoxin 6 Aggravates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Enhancing Mitophagy. *Neuroscience.* 2022;482:30-42.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ГИБЕРНАЦИИ: РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

Шемарова И.В., Никитина Е.Р.

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

Аннотация. Гибернации – природное гипометаболическое состояние, являющееся результатом адаптации холодоустойчивых животных (гибернаторов) к низкой температуре и другим факторам окружающей среды. Важным звеном молекулярной адаптации к холоду у гибернаторов является снижение продукции активных форм кислорода (АФК), инициирующих окислительный стресс (ОС) и наличие эффективной антиоксидантной системы (АОС), которая включает глутатион (GSH), витамин С и витамин Е, а также ферменты – супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT), глутатионпероксидазу (GP), глутатион-S-трансферазу и глутатионредуктазу, тиоредоксины [1]. Усиление антиоксидантной защиты во время гипометаболических состояний – важное эволюционное приспособление у животных, адаптированных к холоду. Однако для человека и животных, не впадающих в спячку, гипометаболизм является не адаптацией (за исключением сна), а скорее негативным фактором, и служит важным биомаркером доклинического проявления болезни или бессимптомно-протекающих заболеваний [2]. В этой связи изучение особенностей функционирования митохондрий, продуцирующих АФК, а также молекулярных механизмов адаптации гибернаторов к ОС, включая механизмы усиления антиоксидантной защиты, имеет важное прикладное значение и в дальнейшем позволит использовать полученные знания в стратегии профилактики многих заболеваний человека.

Холодоустойчивые эндотермные животные при сезонном снижении температуры окружающей среды впадают в оцепенение (торпор) – состояние, характеризующееся крайней степенью гипометаболизма и гипотермии, у облигатных гибернаторов переходящее в зимнюю спячку [3,4]. Для обеспечения целостности клеток у гибернаторов во время спячки (торпора) происходит усиление антиоксидантной защиты организма [5].

Важную роль в переходе животных из состояния бодрствования в состояние зимней спячки играют митохондрии, отвечающие за производство энергии в клетке и в которых протекают процессы клеточного дыхания и свободнорадикального окисления. Митохондриям принадлежит ведущая роль в координации важнейших клеточных

функций, поскольку они участвуют во внутриклеточной сигнализации, генерируют вторичные мессенджеры, являются ключевым звеном в реализации программ клеточной гибели и проч. [6].

К настоящему времени сами митохондрии, их метаболизм и сигнальная функция (через АФК-опосредованную передачу сигналов) достаточно хорошо изучены. Однако механизмы, обеспечивающие чрезвычайную пластичность митохондрий при гибернации, находятся лишь на самом начальном этапе изучения [7].

В ранних работах, посвященных исследованию активности оксидазных систем митохондрий у гибернаторов, было обнаружено значительное подавление активности оксидаз во время естественной зимней спячки [8]. Так, было отмечено, что в митохондриях, выделенных из печени суслика, находящегося в торпоре, NADH-оксидазная и сукцинатоксидазная активности снижаются примерно в 2 раза, в то время как активность цитохромоксидазы (ЦО) зависит от гибернации гораздо в меньшей степени [9].

К настоящему времени установлено, что снижение окислительного фосфорилирования и скорости выработки ATP в митохондриях гибернаторов происходит из-за дефицита O_2 и подавления активности митохондриальных комплексов I и II [10], а также хиноноксидоредуктазы (SQR) - сульфид-окисляющего фермента, доставляющего электроны в электрон-транспортную цепь (ETC) через кофермент Q [11]. Считается, что активность дыхательных белков системы окислительного фосфорилирования регулируется посредством аллостерического ингибирования оксалоацетата - промежуточного метаболита цикла трикарбоновых кислот (TCA), который накапливается из-за снижения активности ферментов цикла TCA, а также посредством эпигенетической регуляции экспрессии и посттрансляционных модификаций внутримитохондриальных киназ и деацетилаз [12]. Кроме того, снижение активности SQR и повышение уровня сульфид-синтезирующих ферментов, главным образом, цистатионин-β-синтазы (CBS), приводит к повышению уровня газотрансмиттера – сероводорода (H_2S), который ингибирует цитохром-*c*-оксидазу в цепи переноса электронов митохондриального комплекса IV [11].

Таким образом, снижение активности митохондрий при оцепенении и во время спячки является результатом пониженной активности ключевых ферментов ETC и TCA [13,14].

Важно подчеркнуть, что как подавление функции митохондрий во время оцепенения, так и повышение активности во время пробуждения у гибернаторов происходит при сохранении достаточного запаса энергии и без клеточных повреждений, вызванных избытком АФК, которое обычно наблюдается при согревании животных (процессом сходным с ишемией/реперфузией) [3,7,15].

Другим механизмом защиты клеток от повреждения АФК является разобщение дыхания митохондрий [7]. Разобщение дыхания митохондрий происходит у гибернаторов из-за относительно высокого уровня разобщающего белка 1 (UCP1), который уменьшает движущую силу протонов и ингибирует генерацию АФК [16]. Этот молекулярный механизм, опосредующий непрерывный термогенез без дрожи (NST) с ключевым участием UCP1, был выявлен в адипоцитах бурой жировой ткани (БЖТ), но степень, в которой гомологи UCP опосредуют NST в других тканях, является пока спорной [17,18].

В общей стратегии защиты от окислительного стресса, гибернаторы также используют механизмы детоксикации АФК, связанные с наличием в клетках антиоксидантной системы [19]. Антиоксидантные механизмы включают в себя редокс-активные низкомолекулярные клеточные соединения (глутатион (GSH), витамины Е и С), а также ферментативные системы метаболизма АФК (SOD, каталаза и GSH-пероксидаза) [20].

АФК, включающие свободные радикалы кислорода, активируют ряд белков, из которых факторы транскрипции Nrf2 и FOXOs являются ключевыми участниками регуляции стресс-активируемых сигнальных путей и клеточного редокс-гомеостаза [20-22]. Отвечая на стрессовый стимул, эти факторы индуцируют экспрессию генов многочисленных антиоксидантных белков таких как каталаза (CAT), митохондриальная супероксиддисмутаза (MnSOD), белок PA26, проксиредоксины Prx3, Prx5, тиоредоксин Trx2 и др. [22].

У гибернаторов в защите клеток от окислительного стресса решающую роль играет транскрипционный фактор FOXO3a. Отмечено, что в период поздней фазы оцепенения происходит 1,5-кратное повышение экспрессия FOXO3a и повышение фосфорилирования FoxO3a по Thr-32. Повышение фосфорилирования FoxO3a при этом сопровождается повышением экспрессии генов детоксикации и 1,2-кратным увеличением фосфорилирования c-Jun N-терминальных киназ [23].

Хотя многие из генов, индуцируемых Foxo3a, непосредственно вовлечены в детоксикацию АФК (например, prdx-3, CAT, MnSOD), активация Foxo3a также усиливает экспрессию генов, которые негативно регулируют клеточный цикл, к ним относятся p27KIP1 и циклин G2. Более того, у гибернаторов активация FOXO3a может также способствовать восстановлению поврежденной ДНК посредством индукции белка gadd45 (в дополнение к регуляции атрофии и гипертрофии скелетных и сердечных мышц посредством экспрессии атрогина-1) [21]. Кроме того, было показано, что белки FOXOs, посредством взаимодействия с различными коактиваторами, участвуют в регуляции метаболизма и других клеточных функций, включая регуляцию адипогенеза и чувствительности к инсулину

с помощью PPARγ (гамма-рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором), модуляцию липидного обмена посредством взаимодействия с ядерным фактором HNF4 и регуляцию уровня глюкозы посредством взаимодействия с киназой Dyrk1 и белком SHP [24-27]. Хотя роль белков FOXOs в зимней спячке частично описана, требует изучения их участие в регуляции липидного и углеводного обменов, так как инициируемые ими метаболические сдвиги, имеют решающее значение для поддержания выживаемости животных во время зимней спячки [21].

Экспрессия генов антиоксидантных ферментов регулируется на уровне транскрипции через cis-активную последовательность, которая известна как элемент антиоксидантого ответа (ARE) [28]. У гибернаторов наиболее тесное взаимодействие отмечено между ARE и фактором транскрипции NRF2 [20]. NRF2 принадлежит к семейству Cap-NCollar-регуляторных белков, которое также включает NRF1, NRF3 и p45NFE2 [29]. NRF2 активирует экспрессию генов некоторых антиоксидантных ферментов и транскрипционных факторов, NADP, шаперонов, факторов роста, лигандов рецепторов и др. [21,30,31]. Под его положительным влиянием находится транскрипция генов, кодирующих протеины, участвующие в детоксикации АФК, ксенобиотиков, транспорте, клеточной репарации и др. [32]. В то же время фактор транскрипции NRF2 ингибирует экспрессию циклооксигеназы-2, iNOS, продукцию провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α [28,33,34]. В регуляции продукции антиоксидантных ферментов принимает участие и NRF1, который регулирует активность протеосомной деградации протеинов и транскрипцию генов глобина [35]. Важно отметить, что экспрессия генов ключевых антиоксидантных ферментов находится под контролем и других факторов транскрипции, зависимых от изменения клеточного редокс-гомеостаза. Так, увеличение продукции SOD связано не только с активностью фактора транскрипции NRF2, но также зависит от усиления внутриклеточных сигнальных путей, ассоциированных с факторами транскрипции AP-1 и NF-κB [36].

В нормальных условиях Nrf2 удерживается в цитоплазме своим ингибитором - Келч-подобным ECH-ассоциированным белком 1 (Keap1). Повышенный уровень АФК вызывает высвобождение Nrf2 из Keap1 и его последующую транслокацию в ядро для взаимодействия с другими факторами транскрипции (Mafs и CBP/p300), что приводит к стимуляции экспрессии генов-мишеней. Активация Nrf2 также опосредуется посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование [37], ацетилирование [5] и убиквитинирование [38]. Важно отметить, что как FOXO, так и Nrf2 являются активаторами транскрипции генов, которые при развитии ОС выполняют функции, выходящие за рамки их

наиболее известных функций в детоксикации АФК. Они включают регуляцию обмена веществ путем стимулирования накопления жира и экспрессии генов липидного обмена, что имеет особое значение при подготовке животных к зимней спячке [21,39].

Хотя повышенная экспрессия генов транскрипционных факторов Nrf2 и FOXOs была обнаружена у гибернирующих млекопитающих, механизмы реализации редокс-реакций и стрессоустойчивости у них пока остаются малоизученными [20].

Известно, что во время зимней спячки экспрессия Nrf-2 во многих тканях, включая бурый жир, сердце, печень и скелетные мышцы, повышается в 2-3,5 раза [40,41]. Нисходящей мишенью Nrf-2 является гемоксигеназа 1 (HO1). Повышенный синтез HO1, как на уровне транскрипции, так и на уровне элонгации отмечен в головном мозге и сердце гибернаторов [42]. В физиологических условиях HO1 катализирует первую стадию деградации гема, приводящую к образованию антиоксидантов (например, биливердина, билирубина), и играет решающую роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза [43]. Недавние исследования показали, что у людей и мышей повышенные уровни мРНК HO1 также связаны с резистентностью к инсулину и ожирением – физиологическими процессами, имеющими важное значение для гибернаторов [44].

Повышенный уровень Nrf-2 был также обнаружен у долгоживущих голых землекопов Heterocephalus glaber. Хотя землекопы не впадают в спячку, они обладают высокой устойчивостью к широкому спектру цитотоксических стрессов, подвергаются метаболической депрессии в ответ на недостаток питательных веществ и понижение температуры тела [45,46]. Высокий уровень Nrf-2 коррелировал у землекопов со снижением экспрессии Keap1 и 10-50-кратным увеличением экспрессии генов антиоксидантов, являющихся нижестоящими мишенями Nrf-2: белками hmox1, gsta1 и nqo1 [46,47].

Вопрос об участии отдельных ферментных компонентов АОС в цитопротекции в разные периоды естественной спячки гибернаторов также изучен недостаточно, но, без сомнения, заслуживает самого пристального внимания.

На повышение продукции ферментов АОС и снижение выработки АФК во время зимней спячки указывают многочисленные исследования [48-50 и др.]. Отмечено, что у летучих мышей Myotis lucifugus, впадающих в спячку, наблюдается более чем на 50% снижение выработки перекиси водорода (H_2O_2) в головном мозге, сердце и почках по сравнению с не впадающими в спячку короткохвостыми землеройками Northern Short-tailed Shrew [48]. Снижение выработки свободных радикалов кислорода у летучих мышей автор объясняет двумя причинами: 1) двукратным

повышением активности SOD в исследованных органах (головном мозге, сердце и почках), 2) повышением их эффективности, что выражается в снижении выработки свободных радикалов на единицу потребляемого кислорода [48]. Ткани летучих мышей Myotis также демонстрируют более низкие уровни карбонилирования белков in vitro, что может свидетельствовать о повышении их устойчивости к окислению при остром ОС [51].

Важно отметить, что усиление синтеза антиоксидантных ферментов во время зимней спячки наблюдается не во всем организме, а лишь в отдельных органах и тканях [52]. Так, во время зимней спячки в БЖТ сусликов содержание CAT, а также SOD1 и SOD2 повышается в 1,5-2 раза [53]. Тенденция к повышению уровней антиоксидантных белков наблюдалась и в скелетных мышцах, однако не наблюдалась в печени или белой жировой ткани [53]. Авторы объясняют это тем, что в печени базальная активность SOD примерно в 4-6 раз выше по сравнению с другими тканями (почками, БЖТ, легкими, сердцем и селезенкой), и эта активность SOD может быть достаточной для поддержания антиоксидантной защиты всего организма во время зимней спячки [53]. Но, хотя селективное усиление антиоксидантной защиты тканеспецифичным образом экспериментально подтверждено, допускается возможность и того, что в поддержании фенотипа зимней спячки решающую роль играют другие механизмы реагирования на стресс [53].

Таким образом, изучение АОС, особенностей регуляции и функционирования митохондрий, а также молекулярных механизмов адаптации гибернаторов к ОС имеет важное медико-биологическое значение и в дальнейшем позволит использовать полученные знания в стратегии профилактики ишемического/ реперфузионного повреждения тканей после реваскуляризации головного мозга, миокарда, внутренних органов, конечностей как при острой, так и при их хронической ишемии, а также в терапии нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний [3, 54].

Работа выполнена в ИЭФБ РАН в рамках госзадания № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2008;390(1-2):1-11.
2. Blázquez E, Hurtado-Carneiro V, LeBaut-Ayuso Y, Velázquez E, García-García L, Gómez-Oliver F, Ruiz-Albusac JM, Ávila J, Pozo MÁ. Significance of Brain Glucose Hypometabolism, Altered Insulin Signal Transduction, and Insulin Resistance in Several Neurological Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13: 873301.

3. Giroud S, Habold C, Nespolo RF, Mejías C, Terrien J, Logan SM, Henning RH, Storey KB. The Torpid State: Recent Advances in Metabolic Adaptations and Protective Mechanisms. *Front Physiol*. 2021;11: 623665.
4. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, Tøien Ø, Barnes BM, LaManna JC, Smith MA, Drew KL. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(5): R1297-R12306.
5. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev*. 2003;83(4): 1153-1181.
6. Tan JX, Finkel T. Mitochondria as intracellular signaling platforms in health and disease. *J Cell Biol*. 2020;219(5):e202002179.
7. Staples JF, Mathers KE, Duffy BM. Mitochondrial Metabolism in Hibernation: Regulation and Implications. *Physiology (Bethesda)*. 2022;37(5): 0. doi: 10.1152/physiol.00006.2022.
8. Закарян АА. Эффекты неокиоторфина как потенциального регулятора процессов гипобиоза: *Автореф. дис. канд. биол. наук* / Москва, 2006. - 20 с.
9. Алламуратов ШИ. Энергетический обмен тепло- и холоднокровных организмов при различных гипометаболических состояниях: *Автореф. дис. док. биол. наук* / Ташкент, 1999. - 41 с.
10. Mathers KE, McFarlane SV, Zhao L, Staples JF. Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes. *J Comp Physiol B*. 2017;187: 227-234.
11. Jensen BS, Pardue S, Duffy B, Kevil CG, Staples JF, Fago A. Suppression of mitochondrial respiration by hydrogen sulfide in hibernating 13-lined ground squirrels. *Free Radic Biol Med*. 2021;169: 181-186.
12. Mathers KE, Staples JF. Differential posttranslational modification of mitochondrial enzymes corresponds with metabolic suppression during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019;317(2): R262-R269.
13. Brooks SPJ, Storey KB. Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel Spermophilus lateralis. *J Comp Physiol B* 2004;62: 3-28.
14. Chazarin B, Storey KB, Ziemianin A, Chanon S, Plumel M, Chery I, Durand C, Evans AL, Arnemo JM, Zedrosser A, Swenson JE, Gauquelin-Koch G, Simon C, Blanc S, Lefai E, Bertile F. Metabolic reprogramming involving glycolysis in the hibernating brown bear skeletal muscle. *Front Zool*. 2019; 16: 12.
15. de Veij Mestdagh CF, Smit AB, Henning RH, van Kesteren RE. Mitochondrial Targeting against Alzheimer's Disease: Lessons from Hibernation. *Cells*. 2023;13(1): 12.
16. Jastroch M. Uncoupling protein 1 controls reactive oxygen species in brown adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114: 7744 -7746.
17. Barger JL, Barnes BM, Boyer BB. Regulation of UCP1 and UCP3 in arctic ground squirrels and relation with mitochondrial proton leak. *J Appl Physiol*. 2006; 101(1): 339-347.
18. Alevriadou BR, Patel A, Noble M, Ghosh S, Gohil VM, Stathopulos PB, Madesh M. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(4): 465-482.
19. Tøien Ø, Drew KL, Chao ML, Rice ME. Ascorbate dynamics and oxygen

consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(2): R572-R583.
20. Jankovic A, Kalezic A, Korac A, Buzadzic B, Storey KB, Korac B. Integrated Redox-Metabolic Orchestration Sustains Life in Hibernating Ground Squirrels. *Antioxid Redox Signal*. 2024;40(4-6): 345-368.
21. Wu CW, Storey KB. Life in the cold: links between mammalian hibernation and longevity. *Biomol Concepts*. 2016; 7(1): 41-52.
22. Моршнева АВ. Транскрипционные факторы FoxO как многофункциональные регуляторы клеточных процессов. *Цитология*. 2020;62(10): 687-698.
23. Wu CW, Storey KB. FoxO3a-mediated activation of stress responsive genes during early torpor in a mammalian hibernator. *Mol Cell Biochem*. 2014; 390(1-2): 185-195.
24. Dowell P, Otto TC, Adi S, Lane MD. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor γ and Foxo1 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2003;278: 45485-45491.
25. Hirota K, Daitoku H, Matsuzaki H, Araya N, Yamagata K, Asada S, Sugaya T, Fukamizu A. Hepatocyte nuclear factor-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor. *J Biol Chem*. 2003; 278: 13056-13060.
26. von Groote-Bidlingmaier F, Schmoll D, Orth HM, Joost HG, Becker W, Barthel A. DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300: 764-769.
27. Lee S, Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol*. 2017;233(2): R67-R79.
28. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47: 89-116.
29. Gęgotek A, Skrzydlewska E, Białka E. CNC w fizjologii i patologii [CNC proteins in physiology and pathology]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69: 729-743.
30. Sykiotis GP, Habeos IG, Samuelson AV, Bohmann D. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14: 41-48.
31. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53: 401-426.
32. Leonardo CC, Doré S. Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. *Nutr Neurosci*. 2011;14(5): 226-236.
33. Soriano FX, Baxter P, Murray L, Sporn MB, Gillingwater TH, Hardingham GE. Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Mol Cells*. 2009;27(3): 279-282.
34. Ullah S, Ahmad T, Ikram M, Rasheed HM, Khan MI, Khan T, Alsahli TG, Alzarea SI, Althobaiti M, Shah AJ. 7-Hydroxy Frullanolide Ameliorates Isoproterenol-Induced Myocardial Injury through Modification of iNOS and Nrf2 *Genes Biomedicines*. 2023; 11(9): 2470.
35. Biswas M, Chan JY. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1): 16-20.
36. Xu L, Yu Y, Sang R, Li J, Ge B, Zhang X. Protective Effects of Taraxasterol

against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NFκB Signaling Pathways in Mice. *Oxid Med Cell Longev Nutr Neurosci.*2018; 8284107.
37. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009; 460(7253): 392-395.
38. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 9372182. doi: 10.1155/2019/9372182.
39. Pang S, Lynn DA, Lo JY, Paek J, Curran SP. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation. *Nat Commun*. 2014;5: 5048.
40. Morin P Jr, Ni Z, McMullen DC, Storey KB. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, Spermophilus tridecemlineatus. *Mol Cell Biochem*. 2008; 312(1-2): 121-129.
41. Xu R, Andres-Mateos E, Mejias R, MacDonald EM, Leinwand LA, Merriman DK, Fink RH, Cohn RD. Hibernating squirrel muscle activates the endurance exercise pathway despite prolonged immobilization. *Exp Neurol*. 2013;247: 392-401.
42. Ni Z, Storey KB. Heme oxygenase expression and Nrf2 signaling during hibernation in ground squirrels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(3): 379-387.
43. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(2): H643-H651.
44. Jais A, Einwallner E, Sharif O, Gossens K, Lu TT, Soyal SM, Medgyesi D, Neureiter D, Paier-Pourani J, Dalgaard K, Duvigneau JC, Lindroos-Christensen J, Zapf TC, Amann S, Saluzzo S, Jantscher F, Stiedl P, Todoric J, Martins R, Oberkofler H, Müller S, Hauser-Kronberger C, Kenner L, Casanova E, Sutterlüty-Fall H, Bilban M, Miller K, Kozlov AV, Krempler F, Knapp S, Lumeng CN, Patsch W, Wagner O, Pospisilik JA, Esterbauer H. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell*. 2014;158(1): 25-40.
45 Larson J, Park TJ. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *Neuroreport*. 2009;20(18): 1634-1637.
46. Lewis KN, Wason E, Edrey YH, Kristan DM, Nevo E, Buffenstein R. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(12): 3722-3727.
47. Lewis KN, Mele J, Hornsby PJ, Buffenstein R. Stress resistance in the naked mole-rat: the bare essentials - a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(5): 453-462.
48. Brunet-Rossinni AK. Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (Myotis lucifugus) versus two non-flying mammals. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(1): 11-20.
49. Wei Y, Zhang J, Yan X, Peng X, Xu S, Chang H, Wang H, Gao Y. Remarkable Protective Effects of Nrf2-Mediated Antioxidant Enzymes and Tissue Specificity in Different Skeletal Muscles of Daurian Ground Squirrels Over the Torpor-Arousal Cycle. *Front Physiol*. 2019;10: 1449.
50. Duffy BM, Staples JF. Arousal from Torpor Increases Oxidative Damage in the Hibernating Thirteen-Lined Ground Squirrel (Ictidomys tridecemlineatus). *Physiol*

Biochem Zool. 2022;95(3): 229-238.
51. Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, Pierce A, Podlutsky AJ, Podlutskaya N, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB J*. 2009; 23(7): 2317-2326.
52. Page MM, Peters CW, Staples JF, Stuart JA. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel Spermophilus tridecemlineatus. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009;152(1): 115-122.
53. Vucetic M, Stancic A, Otasevic V, Jankovic A, Korac A, Markelic M, Velickovic K, Golic I, Buzadzic B, Storey KB, Korac B. The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (Spermophilus citellus): an update. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65: 916-924.
54. Dave KR, Christian SL, Perez-Pinzon MA, Drew KL. Neuroprotection: lessons from hibernators. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012;162(1-3): 1-9.

Сигнализация в растительных клетках

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОБОВ И ДЫХАНИЕ БАКТЕРОИДОВ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ

Богданова Д.С., Крылова В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева, РАН, Москва, РФ

Введение. В настоящее время в современном сельском хозяйстве большое внимание направлено на методы выращивания растений, с применением средств, позволяющих ускорить процесс их роста и развития, обеспечить устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам за счет экологически чистых препаратов и биологически активных веществ. Разрабатываются различные методики обогащения почвы азотом за счет симбиотической азотфиксации, протекающей в корневых клубеньках бобовых.

Важную роль в этом процессе играет симбиосомная мембрана (СМ), разделяющая макро- и микросимбионта, и обеспечивающая транспорт метаболитов и ионов в условиях бобово-ризобиального симбиоза [1]. Изучение этого явления важно для понимания механизмов и регуляции взаимодействия между бобовыми растениями и ризобиями.

Существуют такие соединения – флавоноиды, концентрирующиеся в активных органах растения [2]. Они участвуют в росте, размножении и защитных процессах, происходящих в них. Ключевая роль флавоноидов заключается в регуляции гормонального обмена, его усилении или подавлении [3]. Также флавоноиды защищают от УФ-излучения и патогенов, участвуют в симбиозе [4]. Они представляют собой большую группу соединений с разнообразной структурой (флавоны, флавонолы и. т. д.), что определяет их различную биологическую активность. Флавоноиды проявляют широкий спектр фармакологической активности и противовоспалительные свойства [5].

Кверцетин является одним из эффективных флавоноидов. Он способен стимулировать некоторые физиологические процессы, такие как прорастание семян, рост пыльцы, антиоксидантные свойства и фотосинтез, а также рост и развитие растений [6]. Его нейропротекторные свойства обнаружены в опытах на лабораторных животных [7]. Он ингибирует ряд ферментов, в частности АТФ-зависимые ферменты, и защищает клетки от окислительного стресса.

Процесс дыхания бактероидов относится к метаболическим процессам окисления органических веществ (чаще всего дикарбоновых кислот, таких как малат или сукцинат) для получения энергии [8], которая необходима им для выполнения основной функции – фиксации атмосферного азота в аммиак, который затем используется растением.

Малат способен поглощаться инфицированными клетками клубеньков, через специфический переносчик на плазмалемме, а затем транспортироваться в бактероиды через дикарбоксилатные транспортеры на СМ и внутренней мембране бактероидов [9]. Данный процесс обусловлен градиентами электрического потенциала на мембранах и pH [10, 11].

В связи с вышесказанным, и важной биологической ролью кверцетина представляет интерес изучение его влияния на такую сельскохозяйственную культуру, как кормовые бобы, а именно исследование действия кверцетина на морфометрические показатели и дыхание бактероидов из корневых клубеньков растений.

Материалы и методы. Объектом исследования были кормовые бобы (*Vicia faba* L.*,* сорт Русские чёрные), инокулированные *Rhizobium leguminosarum* HWM VF 3a (ИНБИ РАН).

Растения выращивали в камере фитотрона с 16-часовым фотопериодом при интенсивности света 100-120 Вт/м^2 и температуре 24-25°C в пластмассовых 5-литровых сосудах с кварцевым песком, который предварительно обеззараживали УФ. Семена перед посевом промывали в воде с хозяйственным мылом, дезинфицировали 96%-ным этанолом и затем инокулировали ризобиями. Высевали по 10 штук в каждый сосуд. Влажность почвы поддерживали на уровне 60–70%. Растения подкармливали 2 раза безазотной средой ½ Кнопа и микроэлементами по Ринькису на 14-й и 28-й дни. Кверцетин добавляли в вариант с подкормкой в количестве 50 мкм/мл. Обработку семян кверцетином проводили в течение одного часа до инокулирования. Биометрические показатели измерялись по высоте стебля, длине корня, массе надземной и подземной части растений, массе клубеньков.

Клубеньки 5-7г с корней отбирали белые, крупные, красные внутри, гомогенизировали, а затем с помощью дифференциального центрифугирования разделяли в градиенте плотности перколла 10, 25, 60%, далее промывали, осаждали, получая фракцию симбиосом [12]. К полученному осадку бактероидов, окруженных СМ, добавляли гипоосмотическую среду шока и затем центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 25,40% на ультрацентрифуге Beckman при 30000 об/мин в течении 90 минут. Осадок бактероидов ресуспендировали в инкубационной среде следующего состава: 20 мМ Hepes, 0,4 М сорбита, 2 мМ $MgSO_4$. Белок определяли по методу Бредфорда [13]. Концентрация белка составляла 1-2 мг/мл.

Дыхание бактероидов определяли по поглощению кислорода полярографически, используя электрод типа Кларка, присоединенный к полярографу LP-7 и самописцу EZ-7 (Чехия) [14]. Для определения активности путей окисления бактероидов использовали ингибиторный

анализ. Чувствительность дыхания к KCN определяла активность цитохромного пути, а чувствительность к салицилгидроксамовой кислоте в присутствии цианида – активность цианид-устойчивого пути [15]. Оптимальные концентрации ингибиторов подбирали предварительно.

Во всех экспериментах биологическая повторность была минимум 3-кратной, аналитическая – 3–5-кратной. На рисунках представлены средние значения и их стандартные отклонения, а на графиках данные характерных опытов.

Результаты. Биометрические показатели растений бобов, выращенных в камере фитотрона, измеряли на разных этапах развития. Замеры проводились на 36, 49, 62, 75 сутки от посадки.

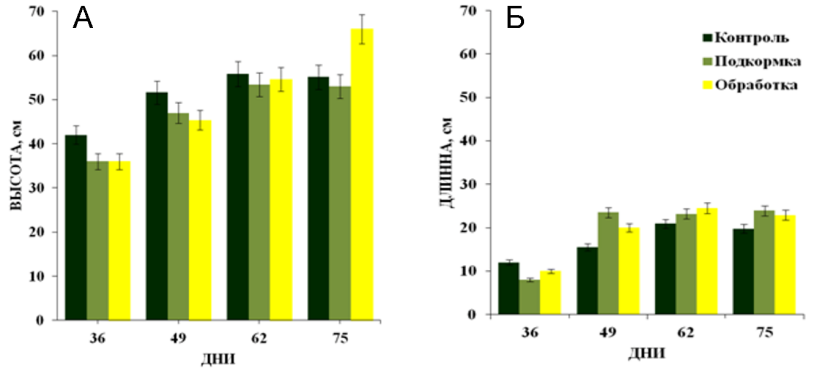


Рис. 1. Влияние кверцетина на ростовые показатели растений бобов. А – рост надземной части; Б – рост подземной части.

На 36 день в фазе начала бутонизации, вариант с подкормкой и обработкой были равны друг другу по высоте, но отставали от контрольного варианта по показателю надземной и подземной частей на ~25% (рис. 1). По массе варианты с обработкой и подкормкой оказались менее развиты, чем вариант с контролем (рис. 2).

На 49 день, в фазе цветения, высота надземной части была больше у контроля на 10,6%. По показателю длина корня (рис. 1), масса подземной и надземной частей наибольшее значение показала подкормка, тогда как контроль оказался наименее результативным (рис. 2).

В фазе образования бобов, на 62 день, высота надземной части у всех вариантов была примерно одинаковой. Показатель подземной части была выше у вариантов обработки и подкормки, чем у контрольного варианта (рис. 1). Подкормка лидировала по массе надземной и подземной частей, а контроль показал наименьшие результаты (рис. 2). Масса клубеньков была у контроля – 0,3 г, обработки – 0,5 г, подкормки – 0,4 г.

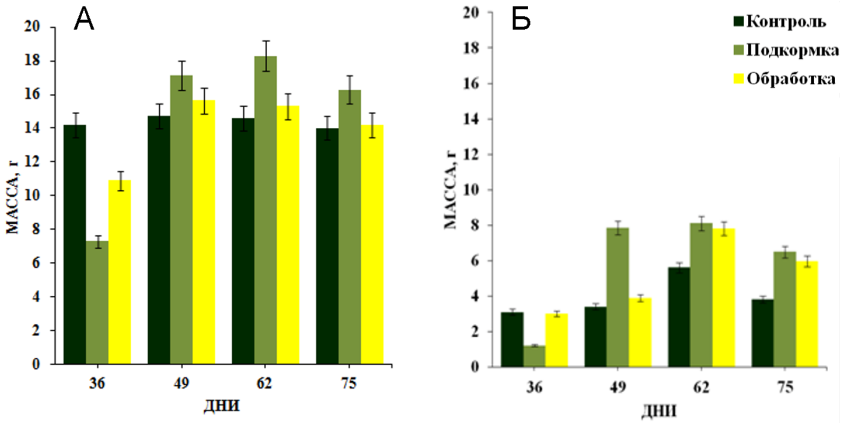


Рис. 2. Влияние кверцетина на массовые показатели растений бобов. А – масса надземной части; Б – масса подземной части.

На 75 день, при достижении полной спелости, обработка кверцетином показала рост надземной части на 19,8 % по сравнению с другими образцами (рис. 1). Масса надземной и подземной частей у подкормки и обработки превышала массу у контрольного варианта (рис. 2). Масса клубеньков была наименьшей у контроля, составляя 0,6 г, у обработки и подкормки – по 0,62 г.

Далее в экспериментах определяли скорость поглощения кислорода бактероидами с СМ и без нее. Показано, что в препаратах симбиосом (бактероиды, окруженные СМ) выделенных из контрольных растений, скорость окисления субстрата составляла 69,2 нмоль • мг белка$^{-1}$ мин$^{-1}$. Последующее добавление экзогенного малата увеличивало скорость окисления до 137,4 нмоль • мг белка$^{-1}$ мин$^{-1}$. Внесение в среду антимицина А – ингибитора окислительного фосфорилирования, а также циклического транспорта электронов в ЭТЦ, не изменяло наблюдаемый процесс. Добавление 2 мМ KCN тормозило скорость дыхания на ~90%, что свидетельствовало о блокировании цитохромного пути окисления. Внесение 2 мМ салицилгидроксамовой кислоты (СГК) в присутствии цианида ингибировало активность альтернативного цианид-резистентного пути окисления. У растений, обработанных кверцетином, наблюдалась подобная картина, но скорости процесса были ниже в 2 раза, чем в контрольном варианте.

У бактероидов без СМ наблюдалась сходная картина, контрольный вариант показывал большую скорость окисления малата по сравнению с вариантом с кверцетином (рис. 3). После добавления цианида наблюдалось

ингибирование дыхания. Полученные результаты свидетельствуют о высокой скорости дыхания бактероидов, которое осуществляется преимущественно по цитохромному пути переноса электронов, сопряженному с синтезом АТФ.

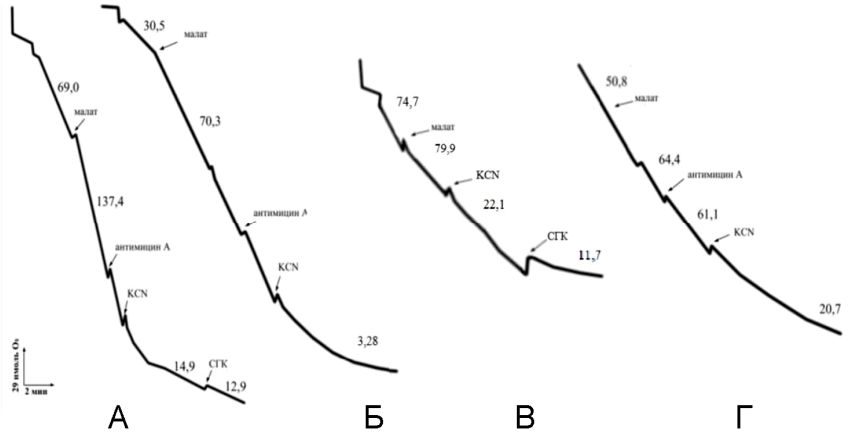


Рис. 3. Поглощение кислорода бактероидами, окруженными СМ: А – без кверцетина; Б – с кверцетином; и без нее: В – без кверцетина; Г – с кверцетином.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что обработка кверцетином семян и подкормка растений способствует росту подземной части растений, увеличивает их биомассу и клубенькообразование, что положительно влияет на увеличение содержания азота в ризосфере, делая растения более устойчивыми к вредителям и болезням. Кроме того, кверцетин снижал скорость окисления малата бактероидами, т.е. дыхания, тем самым регулировал транспорт малата для накопления сахарозы в растении, что способствовало увеличению его сахаристости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Измайлов СФ. Физиология симбиотических взаимоотношений в клубеньках бобовых: биогенез и роль перибактероидной мембраны. *Физиология растений.* 1996;43(5):773-791.
2. Елагина ДС. Закономерности изменения содержания биологически активных веществ - флавоноидов и хлорофиллов Мари белой в зависимости от условий произрастания. *Сборник статей итоговой научно-практической конференции студентов Казанского федерального университета.* 2013;2(1):45-47.

3. Zhang Q, Gangurde SS, Yang X, Zhao C. Roles of flavonoids in crop quality improvement and response to stresses. *Front. Plant Sci.* 2023;14(10):1-3.
4.Wang L, Chen M, Lam PY, Dini-Andreote F, Dai L. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome.* 2022;10(1):1-13.
5. Чиряпкин АС, Золотых ДС, Поздняков ДИ. Обзор биологической активности флавоноидов: кверцетина и кемпферола. *Juvenis scientia*. 2023;9(2):5-20.
6. Singh P, Arif Y, Bajguz A, Hayat S. Shamsul Hayat The role of quercetin in plants. *Plant Physiol Biochem*. 2021;166(10):10-19.
7. Zeng L, Zhang H, Xu C, Bian Y, Xu X, Xie Q, Zhang R. Neuroprotective effects of flavonoids extracted from licorice on kainate-induced seizure in mice through their antioxidant properties. *Biomed. & Biotech.* 2013;14(11):1004-12.
8. Booth JN, Ramesh AS, Smith PMC, Day AD. Malate Transport and Metabolism in Nitrogen-Fixing Legume Nodules. *Front. Plant Sci*. 2021;26(22):2-13.
9. Day DA, Kaiser NB, Thomson R, Udvardi KM, Moreau S, Puppo A. Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules. *Functional Plant Biology*.2001;28(7):669-676.
10. Udvardi MK, Day DA. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1997;48(1):493-523.
11. Krylova VV and Shugaev AG. pH-Dependent Transport of Malate in Vesicles of the Symbiosome Membrane from Broad Bean Root Nodules. *Russ. J. of Plant Physiol,* 2024; 71:196.
12. Andreev IM, Dubrovo PN, Krylova VV, Andreev IN, Koren'kov VD, Sorokin EM, Izmailov SF. Characterization of ATP-hydrolyzing and ATP-driven protontranslocating activities associated with the peribacteroid membrane from root nodules *Lupines luteus* L. *J. Plant Physiol.* 1997;151(1):563-569.
13. Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1976;7:248-254.
14. Шольц КФ, Островский ДН. Ячейка амперометрического определения кислорода. *Методы современной биохимии. Наука.* 1975;1:52-58.
15. Moller IM., Berzi A., van der Plas LH., Lambers H. Measurement of the activity and capacity of the alternative pathway in intact plant tissues. Identification of problems and possible solutions. *Physiol Plant.*1988;72 (43):642-649.

ВЛИЯНИЕ БЛОКИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Будаговская Н.В.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Ионы кальция участвуют в передаче сигналов в клетках растений и кальциевые каналы играют значительную роль в этом процессе [1]. Блокирование кальциевых каналов вносит нарушения в сигнальную сеть и изменяет функциональную активность клеток. Исследования эффекта блокирования кальциевых каналов у растений проводилось, в основном, на субклеточном уровне. Менее изучено влияние блокаторов кальциевых каналов на функциональную активность целого растения или отдельных его органов. Блокирование кальциевых каналов может происходить в природных условиях, например, при выращивании растений на кислых почвах, имеющих широкое распространение. На кислых почвах усиливается поглощение алюминия растениями, который способен блокировать кальциевые каналы. В связи с этим исследование влияния блокирования кальциевых каналов на процессы роста и развития растений имеет как теоретическое, так и практическое значение, так как нарушения в сигнально-регуляторных системах могут влиять на продуктивность сельскохозяйственных растений. Токсическое действие алюминия на растения не ограничивается лишь блокированием кальциевых каналов, поэтому для вычленения этой составляющей его негативного влияния на функциональную активность растений были проведены модельные эксперименты с использованием блокатора кальциевых каналов верапамила. В данной работе представлены результаты экспериментов, связанных с исследованием влияния верапамила на процессы роста и развития побегов и корневой системы и транспорта воды в растениях кукурузы.

Материалы и методы. Растения кукурузы гибрида Пионер выращивали в специализированных камерах при освещении люминисцентными лампами. Использовали водную культуру. Верапамил (10^{-4} М) вносили в корневую зону растений. В контрольных вариантах верапамил отсутствовал. Измеряли размеры побегов и корней в процессе выращивания растений и оценивали их состояние. Водонагнетающую активность корней определяли по интенсивности экссудации, которую измеряли по методу Anderson и House [2] с некоторыми модификациями на изолированных корнях 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°С в шестикратной биологической повторности, применяли термостатирование.

Рис. 1. Влияние верапамила на рост побегов и корней растений кукурузы. Слева два растения - контроль, справа два растения - вариант с верапамилом (10^{-4} М).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены растения контрольного и опытного вариантов. В корневую зону растений опытного варианта был добавлен блокатор кальциевых каналов верапамил, в контрольном варианте он отсутствовал. Можно видеть, что размеры листьев (длина и ширина) и корней растений варианта с верапамилом меньше, чем контрольного варианта (без добавления верапамила). Растения варианта с верапамилом отстают в развитии от контрольных: наблюдается задержка в формировании листьев и корневой системы. Рис. 1 иллюстрирует это: в то время как у контрольных растений имеется три листа, у одновозрастных растений варианта с верапамилом только два. Также можно видеть, что у контрольных растений формируется характерная для кукурузы мочковатая корневая система, у растений опытного варианта сохраняется одиночный корень, но появляются разветвления на конце. Эта морфологическая особенность корней является типичной для растений варианта с верапамилом.

Рис. 2 отражает количественные различия в размерах побегов и корней растений опытного и контрольного вариантов. Верапамил снижает

скорость роста как побегов, так и корней. Линейные размеры этих органов составляют менее 80% от размеров аналогичных органов контрольных растений.

У растений варианта с верапамилом наблюдаются структурные нарушения в листьях. На рис. 1 у растений варианта с верапамилом, имеющих два листа, концы первых листьев подсохшие, вторые листья еще без изменений. При увеличении времени выращивания растений в присутствии верапамила зона подсыхания на первых листьях увеличивается и появляется на концах вторых листьев, образовавшиеся позже третьи листья (более молодые) еще не подвержены изменениям. При длительном выращивании растений варианта с верапамилом на более старых листьях образуются некрозы. Подсыхание листьев растений и наличие некрозов на них являются симптомами дефицита кальция [3]. Внесение блокатора кальциевых каналов в корневую зону растений кукурузы привело к появлению симптомов дефицита кальция на листьях, что может указывать на нарушение транспорта кальция из корней в листья. Передвижение ионов кальция в акропетальном направлении сопряжено с транспортом ауксина в базипетальном направлении [4]. В связи с этим, нарушение транспорта кальция повлечет за собой нарушение транспорта ауксина, гормона, участвующего в процессах роста как побегов, так и корней. По-видимому, угнетение роста побегов и корневой системы у растений варианта с верапамилом (Рис. 1 и 2) может быть обусловлено нарушением транспорта ауксина.

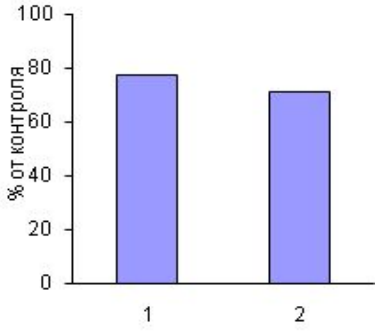


Рис. 2. Размеры побега (1) и корня (2) растения кукурузы варианта с верапамилом (10^{-4} М) в процентах от контроля. Контроль – растения варианта без верапамила.

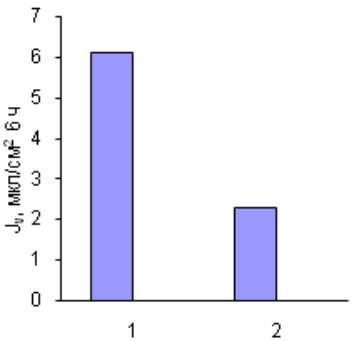


Рис. 3. Влияние верапамила на интенсивность экссудации корней кукурузы за 6 ч, 1 – контроль, 2 – вариант с верапамилом (10^{-4} М).

При продолжительном воздействии верапамила на растения отмечается снижение тургора листьев, что указывает на нарушение водного обмена. Для исследования влияния верапамила на транспорт воды в растениях были проведены эксперименты по определению водонагнетающей активности корней. Верапамил был добавлен в корневую зону, поэтому важно было определить функциональную активность этих органов. Было показано нарушение водонагнетающей активности корней растений варианта с верапамилом (Рис. 3). Снижение водонагнетающей активности корней приводило к уменьшению поступления воды в листья и вызывало падение тургора в их тканях. Нарушение транспорта воды в корнях является существенной причиной подавления роста растений. Уменьшение тургора листьев и стеблей и снижение скорости их роста наблюдалось нами также в опытах с растениями гречихи при внесении верапамила в зону корней [5].

Таким образом, вызванное блокатором кальциевых каналов верапамилом угнетение роста и развития растений кукурузы, а также специфические структурные изменения при формировании побегов и корней могут быть обусловлены нарушениями в кальций-зависимой сигнальной сети, а также снижением транспорта кальция, ауксина и воды в целом растении. Длительное выращивание растений в присутствии верапамила приводило к падению тургора и подсыханию листьев, образованию некрозов на них в результате дефицита кальция и нарушения водного обмена. Индуцированное верапамилом снижение водонагнетающей активности корней вызывало уменьшение поступления воды в побеги и постепенное их высыхание.

ЛИТЕРАТУРА

1. White P.J. Calcium channels in higher plants. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. 1465. p. 171-189.
2. Anderson W. P., House C.R. A correlation between structure and function in the root Zea mays L., J. // Exp. Bot.1967. 18. P. 544.
3. Simon E.W. The symptoms of calcium deficiency in plants. // New Phytol. 80. 1978. P. 1-15.
4. Медведев С.С., Маркова И.В., Шишова М.Ф., Сопова Т.М. О полярном транспорте кальция в растительных тканях. // Вестник ЛГУ. 1989. сер.3. вып. 1, № 3, С.79-83.
5. Будаговская Н.В. Быстрые ростовые реакции растений гречихи на внесение блокатора кальциевых каналов верапамила в корневую зону. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, В.П. Зинченко, А.В. Бережнов (Ред.). Типография «Пятый Формат», Серпухов. 2021. том 2, С. 568-571.

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ МЕНЯЕТ ИХ СУБКЛЕТОЧНУЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ

Ломин С.Н., Савельева Е.М., Архипов Д.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
Москва, Россия

Введение. Цитокинины – это классические гормоны растений. Они обладают плейотропным действием на растения и регулируют множество процессов от активации клеточного деления в культуре клеток и регуляции морфогенеза до модуляции стрессовых ответов. С химической точки зрения цитокинины – это производные аденина, пренелированные по N^6-положению. Молекулярный механизм передачи сигнала этого гормона довольно хорошо изучен. В трансдукции сигнала принимает участие так называемая двухкомпонентная система [1]. Цитокинин воспринимается рецептором – трансмембранной сенсорной гистидинкиназой. После связывания гормона происходит фосфорилирование гистидина в гистидинкиназном домене рецептора. Внутримолекулярно этот фосфат переносится на аспартат ресиверного домена на С-конце белка. Оттуда он передаётся на гистидин мобильного переносчика фосфата – белка фосфотрансмиттера. Этот фактор свободно перемещается по клетке и в ядре передает фосфат на аспартат в ресиверном домене регулятора ответа типа В, который является транскрипционным фактором и регулирует цитокин-чувствительные гены. Кроме того, фосфат может быть передан на регулятор ответа типа А. ни содержат только ресиверный домен и ингибируют сигналинг, осуществляя отрицательную обратная связь в системе. Цитокинины имеют довольно неожиданное место локализации рецепторов. Они в основном расположены на мембране эндоплазматического ретикулума [2,3]. Эти рецепторы способны воспринимать и передавать сигнал и не являются запасным пулом [4]. Также рецепторы присутствуют на плазматической мембране [5,6]. Однако детерминанты, определяющие их локализацию не известны до сих пор. Наше исследование посвящено идентификации механизма локализации белков на эндоплазматическом ретикулуме.

Результаты. Для нашего исследования мы выбрали рецептор цитокининов АНК3 арабидопсиса, т.к. его основное место локализации, продемонстрированное в нескольких работах [2,3], - эндоплазматический ретикулум. Мы использовали для анализа сенсорную область белка, которая фланкирована трансмембранными доменами. Эта область определяет лиганд-связывающие свойства рецептора и его локализацию

[3,7]. Использование фрагмента рецептора упрощает работу технически, так как часто возникают проблемы при сверхэкспрессии полноразмерных рецепторов ввиду их потенциальной токсичности для клетки.

Мы рассмотрели две гипотезы детерминации локализации цитокининовых рецепторов. Одна из них касалась строения трансмембранных доменов, другая – особенностей структуры сенсорных модулей. И литературы известно, что рецептор AHK3 специфично гликозилируется в эндоплазматическом ретикулуме [8]. Мы выявили три сайта гликозилирования N-X-S/T в пределах сенсорного модуля AHK3 (Рис. 1). При этом мы проанализировали еще шесть рецепторов из разных филогенетических групп, локализация у которых подтверждена в эндоплазматическом ретикулуме. Выяснилось, что консервативным является один из трёх найденных сайтов (Рис. 1). Причем этот сайт находится во внешней петле белка, которая не участвует напрямую ни в связывании, ни в передаче сигнала [9]. Это поддерживает гипотезу о влиянии сенсорного модуля на локализацию рецепторного белка.

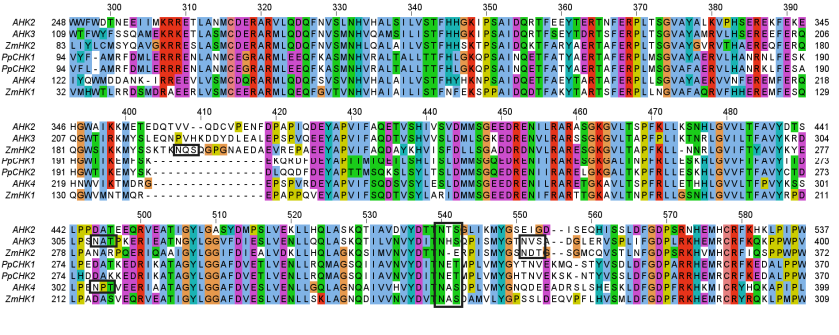


Рис. 1. Выравнивание последовательностей сенсорной области рецептов цитокининов. Черными рамками обозначены потенциальные сайты гликозилирования. AHK2, 3 и 4 – цитокининовые рецепторы арабидопсиса; ZmHK1 и 2 – цитокининовые рецепторы кукурузы; PpCHK1 и 2 – цитокининовые рецепторы мха *Phycomitrium patens*.

Мы создали тройной мутант рецепторного белка, в котором аспрагины в трёх найденных сайтах гликозилирования замененены на глутамины. Полученный мутант, а также исходный контрольный рецептор, были транзиентно экспрессированы в листьях табака *N. benthamiana*. Кроме того, мы создали рецептор, у которого фланкирующие сенсорный модуль трансмембранные домены AHK3, были заменены на аналогичные домены от родственного белка, резидента плазмаллеммы, гистидинкиназы AHK1 [8]. Все созданные гены исследуемых белков были слиты на С-конце с геном флуоресцентного белка GFP Результаты

микроскопических исследований трансформированных листьев представлены на Рисунке 2. В клетках, экспрессирующих исходный AHK3, ядро окаймлено флуоресценным белком, что говорит о локализации белка в эндолазматическом ретикулуме. Аналогичная картина наблюдалась и для рецептора с замененными трансмембранными доменами. Таким образом, структура трансмембранных доменов, по-видимому, не влияет на локализацию рецепторов. А в случае тройного мутанта по сайтам гликозилирования свечение наблюдалось только вдоль клеточной стенки, что указывает на локализацию белка в плазматической мембране.

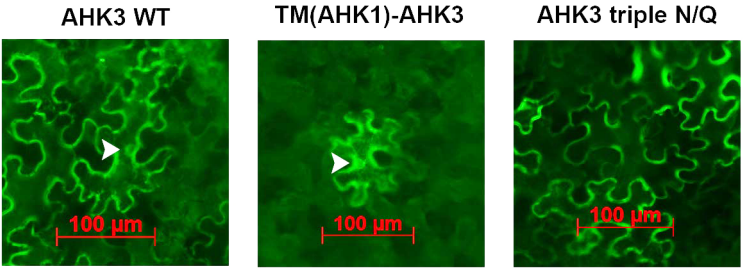


Рис. 2. Локализация модифицированного рецептора цитокиинна AHK3. Показаны результаты флуоресцентной микроскопии свечения GFP, который присоединен к целевым белкам на С-конце. Экспрессия осуществлялась в клетках эпидермиса листьев N.benthamiana. Стрелкой показаны ядра. AHK3 WT – неизмененный рецептор; TM(AHK1)-AHK3 – рецептор с трансмембранными доменами резидента плазмалеммы AHK1; AHK triple N/Q – тройной мутант по трем сайтам гикозилования с заменой аспарагинов на глутамины.

Таким образом локализацию рецепторов цитокинов может определять происходящее специфично в эндоплазматическом ретикулуме гликозилирование сенсорной области рецепторного белка, которая повернута в люмен ретикулума. Важно отметить, что в случае консервативного сайта, его нахождение во внешней петле рецепторного белка делает его доступным для соответствующего фермента. Образующийся в результате гликозилирования углеводный хвост может связываться с неустановленным пока белком-резидентом эндоплазматического ретикулума. Таким образом, в ретикулуме может удерживаться весь белковый комплекс.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-74-10026.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kieber JJ, & Schalle, GE Cytokinin signaling in plant development. Development (Cambridge, England) 2018;145(4):dev149344.
2. Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, & Schmülling T. The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. Plant physiology 2011;156(4):1808–1818.
3. Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, & Sakakibara H Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. Journal of experimental botany 2011; 62(14):5149–5159.
4. Lomin SN, Myakushina YA, Arkhipov DV, Leonova OG, Popenko VI, Schmülling T, & Romanov GA Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. Functional Plant Biology 2017;45(2),192-202.
5. Antoniadi I, Novák O, Gelová Z, Johnson A, Plíhal O, Simerský, R, Mik V, Vain T, Mateo-Bonmatí E, Karady M, Pernisová M, Plačková L Opassathian K, Hejátko J, Robert S, Friml J, Doležal K, Ljung K, & Turnbull C. Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. Nature communications, 2020; 11(1),4284.
6. Kubiasová K, Montesinos JC, Šamajová O, Nisler J, Mik V, Semerádová H, Plíhalová L, Novák O, Marhavý P, Cavallari N, Zalabák D, Berka K, Doležal K, Galuszka P, Šamaj J, Strnad M, Benková E, Plíhal O, & Spíchal L. Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. Nature communications, 2020; 11(1), 4285.
7. Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, & Schmülling T. The specificity of cytokinin signalling in Arabidopsis thaliana is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. The Plant Journal, 2011;67(1),157-168.
8. Caesar K, Thamm AM, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, ... & Harter K. Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. Journal of experimental botany, 2011;62(15),5571-5580.
9. Steklov MY, Lomin SN, Osolodkin DI, & Romanov GA. Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. Plant Cell Reports, 2013;32(6),781–793.

СТРАТЕГИЯ ИЗУЧЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Рощина В.В.[1], Сергиевич Л.А.[1], Яшин В.А.[1], Кучин А.В.[1], Крайнюк Е.С.[2], Солтани Г.А.[3], Шовкун М.М.[4], Демидов В.Э.[4], Куньев А.Р.[1], Хайбулаева Л.М.[1], Призова Н.К.[1]

[1]Институт биофизики клетки,
ФИЦ Пущинский биологический центр РАН, Пущино, Россия
[2]Никитский ботанический сад РАН, Ялта, Россия
[3]Национальный парк, дендрарий, Сочи, Россия
[4]Приокско-Террасный заповедник Данки, Серпухов, Россия

Введение. Сигнальные процессы в растительной клетке происходят как на поверхности клетки, так и внутри ее. Внешними сигналами являются абиотические (УФ-радиация, озон, загрязнители окружающей среды и т. д) и биотические (выделения живых организмов- животных, микробов и других видов растений). Воспринимают внешние сигналы в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы (Рис. 1).

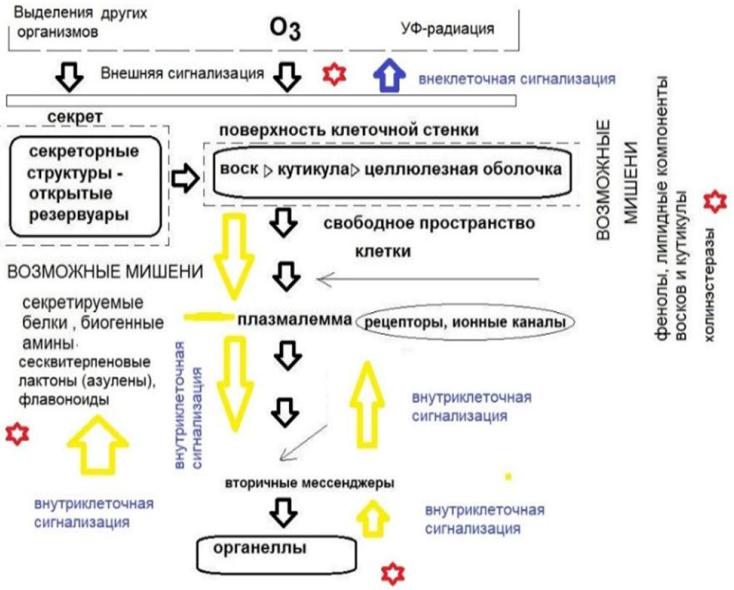


Рис. 1. Схема различных путей сигнализации в растительной клетке. Звездочками обозначены участки, являющиеся сегодня предметом исследований, а желтыми стрелками пути сигнализации.

Сенсорами могут являться и специализированные секреторные клетки (железы, волоски и др.). Через поры клеточной стенки внешние сигналы могут проникать к плазмалемме и тогда происходит распознавание сигнала белковыми рецепторами и передача информации внутрь клетки к органеллам (Рис. 1).

Целью настоящей публикации является рассмотрение стратегии исследований на данном этапе изучений сигнальных процессов, происходящих на поверхности и внутри растительной клетки.

Поверхность клетки. Азулены и холинэстеразы. Роль сенсоров на поверхности выполняют антиоксиданты, такие как компоненты клеточной стенки (за счет фенольных остатков) и низкомолекулярные соединения, а также белковые компоненты секретов, выделяющихся из клетки. У некоторых растений поверхность имеет голубой цвет, который принадлежит пигментам азуленам. Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных [1]. Такие пигменты найдены на поверхности листьев у тридцати видов растений зоны умеренного климата, сухих и влажных субтропиков России [2-4]. На рис. 2 показаны спектры поглощения поверхности клеток листьев очитника, у которого имеется значительное количество азуленов с максимумом 610 нм как на поверхности листьев (10-минутные экстракты этанолом из интактных листьев), так и внутри клеток (24-часовые экстракты). Поскольку азулены являются мощными антиоксидантами, они являются первым участком на поверхности, где осуществляется внешняя сигнализация, будь то абиотические факторы (ультрафиолетовая радиация, озон и др), так и биотические выделения других организмов в биоценозе (например дофамин и серотонин). Здесь благодаря азуленам происходит окисление экзометаболитов, и лишь в значительных концентрациях или через посредников сигнал передается через плазмалемму внутрь клеток.

На поверхность многих растений выходят секретирующие клетки, которые могут выделять белковые и небелковые вещества, контактирующие с внешними сигналами, такими как активные формы кислорода или нейротрансмиттерные вещества (ацетилхолин и биогенные амины). На рис.3 показано обнаружение активности фермента холинэстеразы, катализирующего гидролиз экзогенного ацетилхолина. Этот белок обнаружен в водных смывах с поверхности растительных клеток, его активность снижают ингибиторы холинэстераз прозерин и эзерин. Гистохимическое красное окрашивание на холинэстеразу с помощью Fast Red salt (Рис. 4) позволило обнаружить активность этого фермента внутри железы облепихи *Hippophoe rhamnoides.* У этого же растения на поверхности листьев ранее показано присутствие азуленов. Таким образом, холинэстераза и азулены могут являться первичными сенсорами при внешней абиогенной и биогенной межклеточной сигнализации.

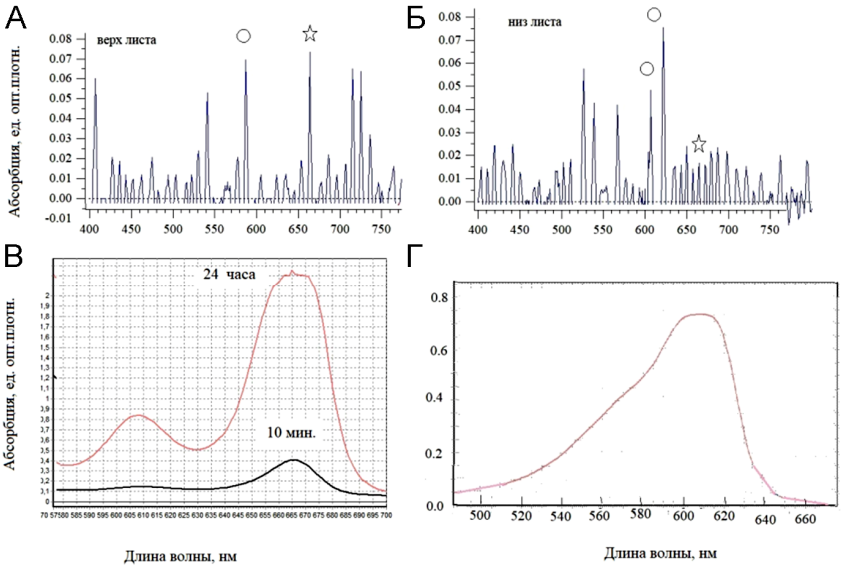


Рис. 2. Спектры поглощения интактных листьев очитника *Hylotelephium telephium* (А, Б), этанольных экстрактов из них (В) и очищенная фракция азуленов (Г)

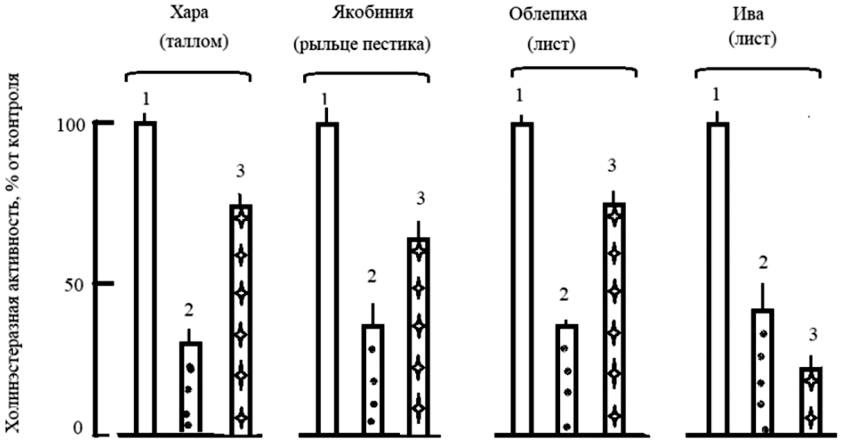


Рис. 3. Холинэстеразная активность смывов с поверхностей разных клеток (экстракция 0.5 М К-фосфатным буфером). Реакция с 0,01 М ацетилтиохолином (контроль, окрашивание DTPDD реагентом) или с предварительной обработкой 10^{-4} М прозерином (2) или эзерином (3).

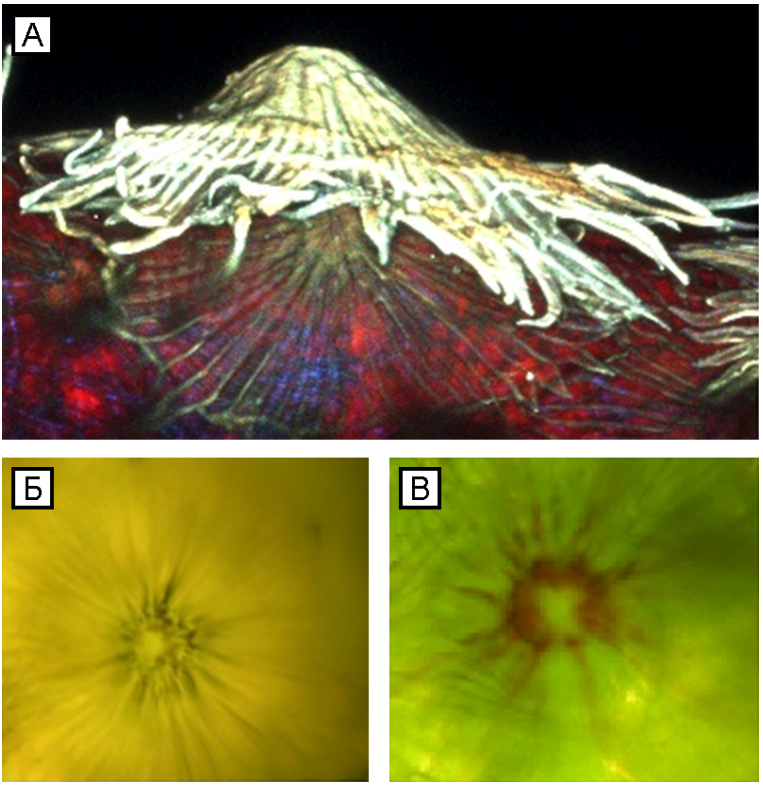


Рис. 4. Холинэстеразная активность секреторной железы на поверхности облепихи. (А) – вид под лазер-сканирующим конфокальным микроскопом, возбуждение 488 нм; (Б) – вид в проходящем свете до гистохимической реакции с Fast Red salt и (В) после. Окрашивается середина открытой железы.

Через поры клеточной стенки внешние сигналы или преобразуются (например, активные формы кислорода в присутствии антиоксидантов) или при избыточной концентрации проникают через клеточную стенку и плазмалемму внутрь клетки к клеточным органеллам.

Клеточные органеллы. Оказалось, что внутри клеток в органеллах, таких как хлоропласты и ядра тоже есть и холинэстераза и азулены. Что касается холинэстераз, то они обнаружены хлоропластах, ядрах и вакуолях [3]. Возможность азуленов быть сенсорами активных форм кислорода внутри клеток еще не рассматривалась до 2024 года, когда в азулен-содержащих трех видов клевера было обнаружено присутствие азуленов в изолированных хлоропластах клевера [4]. Эта фракция азуленов (рис.5) имела характерный для азуленов максимум 600 нм в спектре поглощения. В другой серии опытов изолировали хлоропласты и ядра из известного азулен-содержащего растения тысячелистника обыкновенного *Achillea millifolium* (Рис. 6). Ядра изолировали из белых лепестков, а хлоропласты – из листьев. Целые лепестки и листья имели характерный для азуленов максимум 599-600 нм в спектре поглощения, также как и выделенные из них ядра, которые в отличие от бесцветных секреторных клеток, прокрашивались реагентом на ДНК Hoechst 33258. Гистохимическое окрашивание вызывало синюю флуоресценцию ядер за счет образования комплекса с нуклеиновой кислотой.

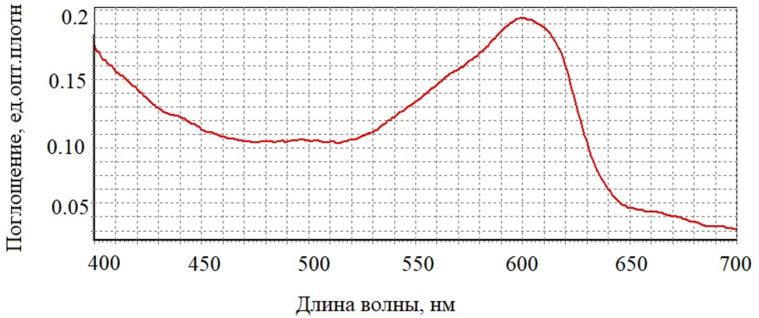


Рис. 5. Фракция азуленов, очищенная их интактных изолированных хлоропластов клевера *Trifolium pratense.*

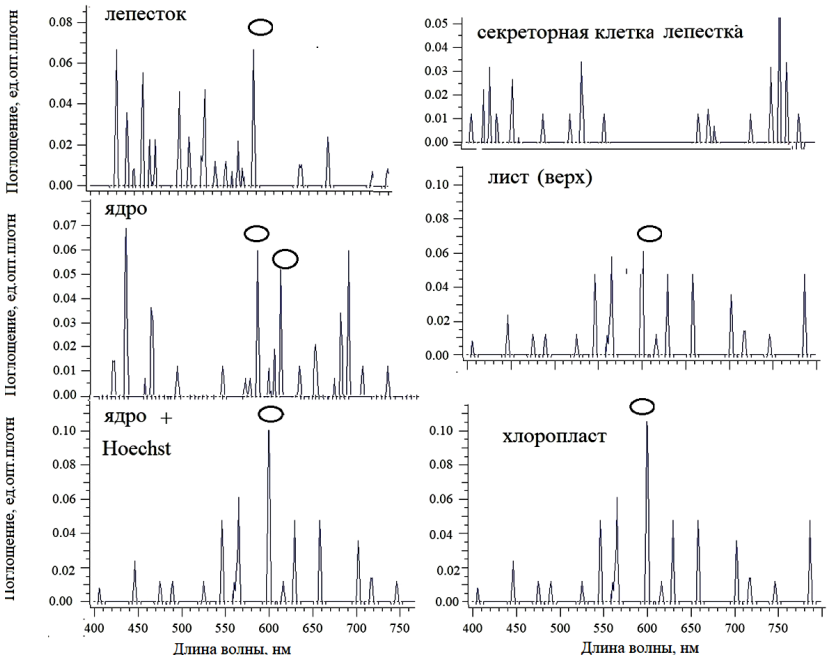


Рис. 6. Спектры поглощения лепестков, листьев тысячелистника *Achillea millifolium* и изолированных из них органелл. Круги – максимумы азуленов.

Табл. 1. Содержание азуленов в мг/г сырого веса.

Средняя полоса		Субтропики Крыма	
Вид	Азулены	Вид	Азулены
Ahthriscus sylvestris L.	790 ± 10	*Cistus tauricus* J.Presl et C. Presl	680 ± 5
Filipendula vulgaris L.	746 ± 7	*Elaeagnus angustifoli*a L.	643 ± 9
Centaurea phrygia L.	772 ± 9	*Jacobea maritima* DC.	721 ± 8

Практические возможности использования азулен-содержащих растений. Сезонные исследования азуленов в Средней полосе России [4] и сухих субтропиках Крыма [5] показали, что азулены могут быть постоянными метаболитами или накапливаться преимущественно в апреле – июне в зависимости от вида растения. Листья этих растений представляют ценный материал для фармации (Табл. 1).

В опытах на мышах с этанольными экстрактами спор хвоща полевого *Equisetum arvense* L., обогащенных азуленами (Табл. 2) или растворами искусственно синтезированного азулена [6], показаны радиозащитные эффекты этих препаратов.

Табл. 2. Среднее время дожития (СВД) и средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей, облученных в дозе 6.5 Гр, после употребления экстрактов хвоща *Equisetum arvense (1:10 w/v).*

Препарат	СВД	СПЖ
Вода (облученный контроль)	55.9± 14.0	298.0± 26.7
Водный экстракт	60.3± 18.3	337.0± 24.4
Спиртовой экстракт (содержит азулены)	142.3± 38.4	387.5± 32.3

В дальнейшем предстоит исследование сенсорных механизмов на поверхности и внутри растительных клеток с участием экзометаболитов и секреторных продуктов азуленовой природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bakun P., Czarczynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. Med.Chem.Res. 2021; 30: 834-836
2. Рощина ВВ., Кучин АВ, Куньев А., Солтани ГА, Хайбулаева ЛМ, Призова НК. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. Биологические мембраны, 2022; 39 (1): 54–62.
3. Рощина ВВ. Холинэстераза клеточных органелл. Биологические мембраны, 2018; 35:
4. Roshchina VV., Shovkun MM., Demidov VE. Spectral search of azulene-containing plants of temperate climate as possible new biological resources for pharmacy. J Med Plant Herbs 2024; 3(3): 1-14
5. Roshchina VV., Kraynyuk E.S. Spectral studies for the search for azulene-containing plants in dry subtropics of the Crimea. J Plant Biol Agron. 2025;4 :101
6. Рощина ВВ., Сергиевич Л.А. Исследование влияния азуленов как защитных факторов на жизнеспособность мышей. Актуальные вопросы биологической физики и химии 2024; 9 (2): 168-173.

РЕГУЛЯЦИИ STATE TRANSITIONS В КЛЕТКАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Рыжих Ю.С.[1], Рашимова А.Д.[2], Борисова-Мубаракшина М.М.[1], Ветошкина Д.В.[1]

[1]Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия
[2]Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Пущино, Россия

Введение. Одним из важнейших факторов для поддержания аквакультур различных одноклеточных водорослей является уровень освещенности. Неравномерное распределение освещенности и ее быстрое изменение в культуре одноклеточных водорослей делает необходимой постоянную «тонкую настройку» фотосинтетического аппарата под действующую интенсивность света. Одним из важных механизмов такой адаптации является регуляция размера светособирающей антенны ФС2, которая может происходить как в короткие времена (минуты), так и в более длительные (дни).

У микроводорослей одним из механизмов регулирования распределения поглощаемой энергии между фотосистемами является процесс state transitions, который представляет собой перераспределение части светособирающих комплексов фотосистемы 2 (LHCII) между двумя фотосистемами (ФСI и ФСII) [1].

Необходимым этапом протекания state transitions является активация STT7-киназы и фосфорилирование белков, входящих в состав LHCII, что в свою очередь приводит к миграции этих комплексов от ФС2 к ФС1 [2]. Механизм активации/ингибирования STT7-киназы в настоящее время до конца не изучен, особенно при действии стрессовых факторов, в частности при увеличении освещённости.

TAP38-фосфатаза – второй необходимый фермент для протекания state transitions. Этот белок дефосфорилирует LHCII, ассоциированные с ФС1, и делает возможной их возвращение к ФС2 [3].

Действие стрессовых факторов на растения приводит к накоплению в клетках активных форм кислорода, в основном пероксида водорода. На основании предыдущих исследований сигнальной и регуляторной роли пероксида водорода нами было предположено, что при действии стрессовых факторов пероксид водорода, может участвовать в регуляции протекания state transitions. Реализовано участие пероксида водорода

может быть за счет влияния на STT7-киназу, в регуляторной части которой содержатся цистеиновые остатки, которые как известно являются основной мишенью пероксида водорода в биологических клетках. Кроме того, для некоторых фосфатаз показана регуляция активности пероксидом водорода. Взаимодействие TAP38 с пероксидом водорода не изучено. Таким образом, активность одного или обоих ключевых ферментов state transitions может зависеть от количества пероксида водорода в клетке.

Цель работы: изучить регуляцию процесса state transitions у фотосинтезирующих организмов при возрастании освещенности

Результаты. Показано, что кратковременное (минуты) повышение освещенности клеток *Chlamydomonas reinhardtii* до 500 мкмоль квантов/м^{2}с приводит к возрастанию протекания state transitions, который в этих условиях является, по-видимому, основным фотопротекторным механизмом. Возрастание протекания state transitions детектировали по возрастанию соотношения флуоресценции хлорофилла *a*, связанного с ФС1 по отношению к флуоресценции хлорофилла a, связанного с ФС2 и с помощью расчета параметра st2/st1. Измерение флуоресценции хлорофилла проводили при температуре жидкого азота, что позволяет детектировать флуоресценцию хлорофилла *a*, связанного с ФС1 и ФС2. Однако при дальнейшем увеличении освещенности до 1000 мкмоль квантов/м^{2}с в клетках дикого типа наблюдали снижение интенсивности state transitions. Интересно, что при освещении светом с интенсивностью 1000 мкмоль квантов/м^{2}с происходило ингибирование перехода клеток из состояния 2 в состояние 1, то есть ингибирование возвращения антенны к ФС2.

На соотношение F715/F685 клеток с заблокированным синтезом STT7 киназы кратковременное повышение интенсивности света до 500 мкмоль квантов/м^{2}с не оказывало влияния. При увеличении освещенности до 1000 мкмоль квантов/м^{2}с наблюдали возрастание F715/F685 в клетках с заблокированным синтезом STT7, не связанное со state transitions.

Добавка пероксида водорода к клеткам *C.reinhardtii* при освещении низким светом вызывала инициацию state transitions, что схоже с эффектом повышенной освещенности (до 1000 мкмоль квантов/м^{2}с). При добавке 5 мМ пероксида водорода увеличивалось соотношение F715/F685, то есть возрастал переход LHCII от ФС2 к ФС1 при чем данный переход был обратимым, т.е. LHCII были способны возвращаться к ФС2 при освещении дальним красным светом в присутствии DCMU.

При добавке к клеткам 10 мМ пероксида водорода происходило ингибирование перехода клеток из состояния 2 в состояние 1, то есть ингибирование возвращения антенны к ФС2, схожее с таковым при 1000 мкмоль квантов/м^{2}с. На клетки с заблокированным синтезом STT7-киназы добавка пероксида водорода в выбранных концентрациях не оказывала влияния.

Таким образом, в данной работе впервые показано увеличение F715/F685 и повышение интенсивности протекания state transitions при добавке пероксида водорода к клеткам *C. reinhardtii* при низкой интенсивности света, схожее с таковым при повышении интенсивности освещения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen J.F. State transitions–a question of balance//Science, 2003, Т. 299, N 5612, С. 1530-1532.
2. Rochaix J. D. // State transition kinases and redox signal transduction in chloroplasts //Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling /. – С. С. 463-477.
3. Wei X., Guo J., Li M., Liu Z. Structural Mechanism Underlying the Specific Recognition between the Arabidopsis State-Transition Phosphatase TAP38/PPH1 and Phosphorylated Light-Harvesting Complex Protein Lhcb1, 2015, Т. 27, N 4, С. 1113-1127.

Действие физиологически активных соединений. Фармакологические мишени внутриклеточной сигнализации

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ У КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Богатова К.С., Яковлева О.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Мигрень представляет собой заболевание, для которого характерны приступы умеренной или сильной головной боли и обратимые неврологические и системные симптомы: фото- и фонофобия, кожная аллодиния, желудочно-кишечные расстройства (тошнота, рвота), головокружение и когнитивные нарушения [1]. Предполагается, что основным физиологическим механизмом, лежащим в основе ауры мигрени, является распространяющаяся кортикальная деполяризация (РКД) – медленно распространяющаяся волна деполяризации нейронов и глии, которая сопровождается изменением трансмембранных ионных градиентов и потерей спонтанной и вызванной нейрональной активности [2,3]. Одним из предполагаемых механизмов, участвующих в развитии РКД, является отсутствие упорядоченной возбудимости нейронов из-за снижения энергетических запасов клеток коры [4]. Другой причиной возникновения РКД считается избыточное содержание ионов K^+ вне клеток [5]. Исследования показали, что РКД может спровоцировать высвобождение воспалительных веществ, усиливая сигнальные пути боли [6]. Согласно клиническим исследованиям, у пациентов с мигренью часто обнаруживают повышенный уровень гомоцистеина в крови [7]. Было выявлено, что гипергомоцистеинемия вызывает нарушение функции эндотелия и окислительный стресс [8,9], которые, предположительно, могут участвовать в развитии мигрени [10].

Целью исследования было изучить влияние гипергомоцистеинемии на поведенческие и электрические маркеры мигрени у крыс.

Материалы и методы. Исследование проводили на самцах крыс линии Wistar в возрасте 5-7 месяцев, которые были разделены на 4 группы: контрольная (К) и гипергомоцистеиновая (ГГц) – животные от самок на стандартной и метиониновой диете, контроль-мигрень (К-мигрень) и гипергомоцистеин-мигрень (ГГц-мигрень) – животные контрольной и гипергомоцистеиновой группы с моделью хронической мигрени.

Для моделирования хронической мигрени крысам проводили операцию на черепе, в ходе которой сверлили отверстие над областью теменной коры (AP – 7 мм, ML – 3 мм) и возводили вокруг него «ванночку» из стоматологического акрила [11]. Хроническую мигрень формировали повторными аппликациями KCl (1 М) на твердую мозговую оболочку в течение 9 дней через день. Крысам контрольной и ГГц групп

вместо KCl вводили 0.9% раствор NaCl. В ходе моделирования мигрени проводили поведенческие исследования: тест «Темно-светлая камера» – для оценки тревожности и светобоязни крыс, тест «Волоски Фрея» – для анализа механической чувствительности задней лапы крыс.

По окончании моделирования мигрени исследовали электрическую активность соматосенсорной коры головного мозга крыс с помощью 16-тиканального электрода с расстоянием между регистрирующими электродами 100 мкм (место введения: AP – 2.5 мм, ML – 5.5 мм). РКД вызывали аппликацией KCl (1 М) на твердую мозговую оболочку (AP – 5.5 мм, ML – 4.5 мм) в течение 2 часов. При анализе записей оценивали общее количество РКД, латентный период от момента аппликации KCl до возникновения первой РКД и амплитуду каждой РКД; частоту спонтанной активности (множественные потенциалы действия) и амплитуду вызванных потенциалов в ответ на механическую стимуляцию вибрисс. По истечении 2 часов проводили отмывку раствором искусственной спинномозговой жидкости и смотрели восстановление спонтанной и вызванной активности.

Результаты. Поведенческие исследования показали усиление тревожности и появление светобоязни при моделировании мигрени у крыс групп К-мигрень и ГГц-мигрень. Так, в группе К-мигрень наблюдалось постепенное снижение времени пребывания в светлой камере (с 76.0 ± 9.4 с до моделирования мигрени, до 39.4 ± 6.2 с на 9 день, $p < 0.05$). У группы ГГц-мигрень данный параметр резко увеличился уже в 1 день: до аппликации KCl – 57.0 ± 7.8 с, на 1 день – 29.6 ± 7.0 с ($p < 0.05$), на 9 день – 17.6 ± 5.5 с ($p < 0.05$), что говорит о развитии тревожности и светобоязни. Также было выявлено увеличение механической чувствительности задней лапы, однако, у группы ГГц-мигрень эти изменения происходили быстрее и были более явными (рис. 1). В группах контроль и ГГц данные показатели не менялись.

При анализе электрической активности наблюдалось снижение общего количества РКД в группе ГГц (5.4 ± 2.6 шт) по сравнению с контролем (19.8 ± 7.3 шт). После моделирования хронической мигрени данный параметр снижался в обеих группах (К-мигрень – 14.3 ± 5.2 шт, ГГц-мигрень – 2.0 ± 2.0 шт). Латентный период от момента аппликации KCl до появления первой РКД в контроле составил 122.9 ± 82.0 с, в ГГц группе – 37.8 ± 9.2 с, в группе К-мигрень – 40.4 ± 11.9 с, в группе ГГц-мигрень – 380.0 ± 260.0 с. Амплитуда РКД в контрольных группах не различалась (контроль – 7.7 ± 0.6 мВ, К-мигрень – 5.5 ± 0.5 мВ), тогда как в группе ГГц она была выше контроля (11.6 ± 1.0 мВ, $p < 0.05$), а в группе ГГц-мигрень амплитуда РКД была минимальна (3.0 ± 0.8 мВ, $p < 0.05$).

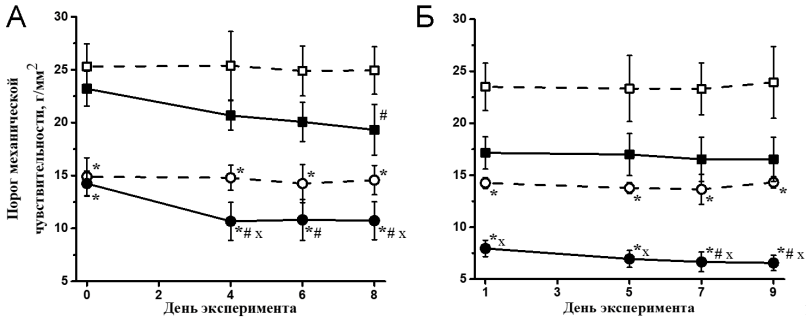


Рис. 1. Изменение порогов базальной (А) и пост-аппликационной (Б) механической чувствительности у крыс при моделировании хронической мигрени: белые квадрат и круг – группы К и ГГц, черные квадрат и круг – группы К-мигрень и ГГц-мигрень. Отличия достоверны при $p < 0.05$: * относительно контроля, # относительно фоновых значений, X относительно группы ГГц.

Спонтанная активность нейронов соматосенсорной коры головного мозга крыс до аппликации KCl была снижена в группах ГГц (9.9 ± 0.6 ПД/с, $p < 0.05$) и К-мигрень (3.3 ± 0.3 ПД/с, $p < 0.05$) относительно контроля (15.0 ± 0.4 ПД/с), но увеличена в группе ГГц-мигрень (14.6 ± 0.7 ПД/с, $p < 0.05$). После аппликации KCl в контрольной и ГГц группах наблюдалось снижение частоты множественных потенциалов действия с последующим восстановлением к концу записи (рис. 2). У крыс с моделью хронической мигрени аппликация KCl вызывала увеличение спонтанной активности в обеих группах (рис. 2).

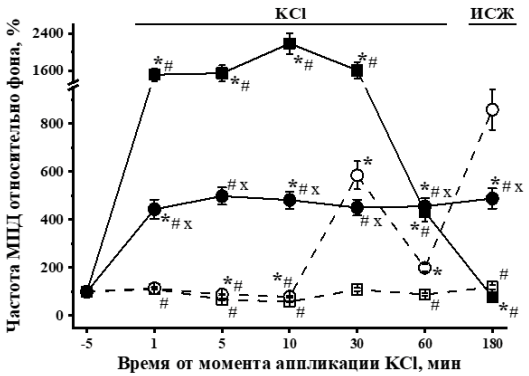


Рис. 2. Изменение частоты множественных потенциалов действия (МПД) в течение 180 минут после аппликации KCl (1 М): ИСЖ – искусственная спинномозговая жидкость; обозначения как на рис. 1.

Амплитуда вызванных потенциалов до аппликации KCl была снижена в группах ГГц (171.8 ± 16.6 мкВ, $p < 0.05$) и ГГц-мигрень (371.6 ± 45.4 мкВ, $p < 0.05$) по сравнению с группами контроль (583.9 ± 87.9 мкВ) и К-мигрень (742.1 ± 49.5 мкВ), но в группе ГГц-мигрень данный параметр был выше относительно ГГц ($p < 0.05$). Аппликация KCl вызывала уменьшение амплитуды вызванных потенциалов в контрольной и ГГц группах, тогда как в группе К-мигрень данный показатель кратковременно снижался, а затем увеличивался (рис. 3). В группе ГГц-мигрень наблюдалось увеличение амплитуды вызванных потенциалов, которая затем снижалась (рис. 3).

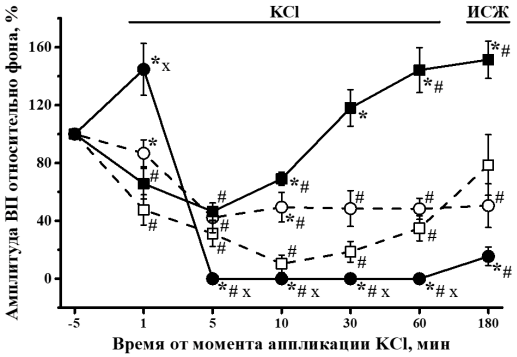


Рис. 3. Изменение амплитуды вызванных потенциалов (ВП) в течение 180 минут после аппликации KCl (1 М): ИСЖ – искусственная спинномозговая жидкость; обозначения как на рис. 1.

Заключение. Повторные аппликации KCl (1 М) вызывают развитие светобоязни и механической аллодинии у крыс обеих групп, а пренатальная гипергомоцистеинемия усугубляет развитие мигренеподобного состояния. Можно предположить, что хроническое воздействие KCl на твердую мозговую оболочку, с одной стороны, усиливает чувствительность нервной ткани к внешним воздействиям (увеличивается амплитуда вызванных потенциалов), а с другой – негативно сказывается на состоянии нейронов, из-за чего аппликация KCl во время электрофизиологического исследования вызывает меньшее количество и сниженную амплитуду распространяющейся кортикальной деполяризации и не угнетает спонтанную нейрональную активность, как это происходит в группах без хронической мигрени.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dodick DW. Migraine. *Lancet*. 2018;391(10127):1315-1330.
2. Harriott AM, Takizawa T, Chung DY, Chen SP. Spreading depression as a preclinical model of migraine. *J Headache Pain*. 2019;20(1):45.
3. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1065-1096.
4. Fleischmann R, Strauß S, Reuter U. Treating episodic migraine with precision: the evolving landscape of targeted therapies driven by insights in disease biology. *Expert Opin Biol Ther*. 2025;1-15.
5. Haanes KA, Edvinsson L. Pathophysiological mechanisms in migraine and the identification of new therapeutic targets. *CNS Drugs*. 2019;33(6):525-537.
6. Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg AMJM, Karatas H. Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. *J Headache Pain*. 2021;22(1):55.
7. Liampas I, Siokas V, Mentis AA, et al. Serum homocysteine, pyridoxine, folate, and vitamin B12 levels in migraine: Systematic review and meta-analysis. *Headache*. 2020;60(8):1508-1534.
8. Tietjen GE, Collins SA. Hypercoagulability and migraine. *Headache*. 2018;58(1):173-183.
9. Chen S, Dong Z, Zhao Y, et al. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction involving the crosstalk between oxidative stress and mitochondrial pSTAT3 in rat ischemic brain. *Sci Rep*. 2017;7(1):6932.
10. Paolucci M, Altamura C, Vernieri F. The role of endothelial dysfunction in the pathophysiology and cerebrovascular effects of migraine: A narrative review. *J Clin Neurol*. 2021;17(2):164-175.
11. Akcali D, Sayin A, Sara Y, Bolay H. Does single cortical spreading depression elicit pain behaviour in freely moving rats? *Cephalalgia*. 2010;30(10):1195-1206.

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ГЕНЕЗА ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ, ВОЗРАСТНЫХ И ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Гончаров Н.В.[1,2], Попова П.И.[3], Белинская Д.А.[2], Войтенко Н.Г.[2], Савельева Е.И.[1], Авдонин П.В.[4]

[1]ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия
[2]ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3]Городская поликлиника № 112, Санкт-Петербург, Россия
[4]ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. Повреждение эндотелия является как причиной, так и следствием многих заболеваний, особенно у людей пожилого возраста. Исследования показывают, что сосудистые факторы риска связаны с различными формами деменции. Однако существует потребность в диагностических методах и показателях, позволяющих решить проблему стратификации риска когнитивных нарушений на ранних стадиях их развития. Сопряженная проблема – исследование механизмов развития когнитивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний у лиц пожилого возраста с профпатологией, возникшей в результате многолетней работы с высокотоксичными органофосфатами (ОФ). Актуальной задачей является поиск диагностических и прогностических маркеров, оценка риска и вероятности летального исхода инфекционных заболеваний, включая COVID-19. Кровь является средой для многих биологически активных соединений, субстратов и продуктов метаболизма, и в наибольшей степени отражает изменения, происходящие в организме. В последнее десятилетие ключевыми особенностями развития методологии диагностики заболеваний и стратификации риска критических состояний являются т.н. «жидкая биопсия» и мультимаркерная стратегия. Цель нашего многоэтапного комплексного исследования состоит в поиске маркеров эндотелиального генеза у лиц пожилого возраста с когнитивными нарушениями, с профессиональной патологией, полученной в результате работы с высокотоксичными органофосфатами (ОФ), а также у лиц с высококонтагиозными заболеваниями на примере подтвержденного COVID-19.

1. Маркеры нарушения функции эндотелия у пожилых пациентов с когнитивными нарушениями и профессиональными заболеваниями. Проведено иммунологическое и биохимическое профилирование лиц пожилого возраста с острым (ОНМК, AIS) и хроническим (ХНМК, CCCI) нарушением мозгового кровообращения,

преддиабетом или впервые выявленным диабетом (СД, DM) и подкорковой сосудистой деменцией (ПСД, SIVD). Максимальное количество значимых отклонений от показателей контрольной группы зарегистрировано у пациентов группы DM, далее по убыванию следуют пациенты групп SIVD, AIS и CCCI. Это свидетельствует о том, что хроническое нарушение мозгового кровообращения – наиболее «естественная» патология, сопутствующая процессу старения организма. В группе SIVD предполагается ремоделирование сосудов по механизму эндотелиально-мезенхимального перехода, что соответствует стадии декомпенсации и снижения Т- и В-клеточного иммунного ответа. Наиболее высокий уровень фактора Виллебранда у пациентов этой группы сопряжен с минимальной активностью ADAMTS-13, что повышает риск микротромбозов.

По результатам первичного обследования контингента лиц с профпатологией, состоящих на учете МСЧ-29 ФМБА России в г.Новочебоксарске, у многих из них имелись признаки развития болезней Паркинсона и Альцгеймера, что в прежние годы не принималось во внимание при наблюдении за состоянием их здоровья. Предварительный анализ маркеров микрочастиц, биохимических, гематологических и иммунологических данных свидетельствовал о более выраженных отклонениях (в том числе по маркерам эндотелиального генеза) от условной возрастной нормы в группе лиц с неспецифической профпатологией. Поэтому для выявления специфических факторов именно ФОС-индуцированной возрастной патологии была сформирована выборка из 143 обследованных, распределенных на 2 группы: контроль (куда вошли пациенты без профзаболеваний и с неспецифическими профзаболеваниями) и ФОВ (сотрудники с профзаболеванием, обусловленным работой с ФОС/ФОВ). Важно отметить, что группы не отличались по среднему возрасту и гендерному составу. У представителей группы ФОВ статистически значимо чаще отмечали или диагностировали полинейропатию (ПНП), в т.ч. сочетанную ПНП верхних и нижних конечностей; проблемы с памятью и мышлением; сложности в выполнении повседневных дел из-за проблем с памятью; сложность удерживания равновесия; чувство тревоги, тоски и депрессии; субъективные симптомы неврологического статуса; патологические кистевые рефлексы; признаки черепно-мозговых изменений; нарушения вибрационной и дистальной чувствительности. В то же время, не было выявлено отличий между группами по тестам MMSE, SAGE и «часы»; по признакам нарушения координации; по наличию патологических стопных рефлексов. Также в обеих группах с одинаковой частотой отмечено угнетение брюшных, ахилловых и подошвенных рефлексов, гипотермия конечностей и гипергидроз.

В группе ФОВ наблюдается снижение числа эритроцитов и гематокрита и увеличение числа тромбоцитов. Общие клинические показатели белой крови – без отличий между группами. Из 35 биохимических показателей сыворотки, определение которых проводилось на биохимическом анализаторе, статистически значимые изменения выявлены по 12 показателям, из них 3 могут быть связаны с нарушениями состояния эндотелиальных клеток: АСТ, ГГТ и ЩФ. В группе ФОВ повышены значения активности АСТ, ГГТ, липазы, амилазы и холинэстеразы (БХЭ), уровни кальция, ЛПВП и TAS; снижена активность ЩФ и ЛДГ. Однако исследование плазмы крови в «ручном» режиме не выявило повышения активности БХЭ, но выявило повышение эстеразной активности альбумина и снижение активности пероксиредоксина. Не выявлено отличий между группами по уровню антигена и активности vWF, а также по активности ADAMTS13.

Метаболомный анализ с использованием хроматомасс-спектрометрического оборудования показал снижение в группе ФОВ 3-гидроксибутирата (3ГБ) и 2-гидроксибутирата (2ГБ) в 1,4 и 1,6 раза соответственно. Известно, что 2ГБ вырабатывается в тканях, которые синтезируют глутатион. Также установлено снижение в группе ФОВ концентрации ацетил-L-карнитина (ALC), действие которого связывают со снижением уровня свободного и этерифицированного холестерина и арахидоновой кислоты в плазме крови. В связи с обнаруженными изменениями 2ГБ, 3ГБ и особенно ALC, особый интерес представляет исследование профиля этерифицированных и свободных ЖК (ЭЖК и СЖК соответственно). Статистически значимые изменения ЭЖК в группе ФОВ: повышение концентрации миристиновой и миристолеиновой кислот в 1,6 и 1,7 раза соответственно, эруковой кислоты на 11%; снижение концентрации показано (по убыванию степени уменьшения) для докозагексаеновой, эйкозапентаеновой, эйкозатриеновой, маргариновой, арахидоновой, стеариновой и эйкозадиеновой кислот. Следует подчеркнуть максимальное уменьшение эфиров омега-3 кислот. Статистически значимые изменения концентрации СЖК в группе ФОВ: повышение концентрации гептадеценовой, докозагексаеновой, эйкозапентаеновой, эйкозатриеновой, γ-линоленовой, миристиновой, эйкозеновой, арахидоновой, эйкозадиеновой, олеиновой, линолевой, пальмитиновой, линоэлаидиновой, стеариновой, пальмитолеиновой, пентадекановой и маргариновой кислот. Не выявлено уменьшения измеренных СЖК, что отражает повышенную активность липаз.

Далее сгруппировали ЭЖК и СЖК: мажорные, субмажорные, минорные, длинноцепочечные, сверхдлинноцепочечные, насыщенные, ненасыщенные, определили соотношения n3/n6, n3/(n6+n9), n3/(все ЖК). В группе ФОВ понижены суммы мажорных, субмажорных и

сверхдлинноцепочечных ЭЖК, но повышены соответствующие суммы СЖК. Аналогичные изменения в сумме ненасыщенных ЖК: этерифицированные снижены, СЖК повышены. Кроме того, повышена сумма минорных, длинноцепочечных и насыщенных СЖК. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что у представителей группы ФОВ важнейшим цитотоксическим фактором для эндотелия сосудов являются СЖК. Изменение соотношений омега-3 с другими ЖК наблюдали только для этерифицированных форм. Все три рассчитанных индекса указывают на снижение концентрации омега-3 ЭЖК в группе ФОВ. Отметим выраженное повышение уровня миристолеиновой и миристиновой ЭЖК; последняя известна как фактор повышения резистентности к инсулину.

По иммунологическим показателям, отличия между группами выявлены в относительном и абсолютном количестве предшественников плазматических клеток с фенотипом IgD-CD27++ (повышение) и только в абсолютном количестве популяции CD38++CD27++ (повышение). Среди субпопуляций Т-клеток, установлено повышение абсолютного уровня клеток TEMRA CD4+, которые обладают высокой цитотоксичностью, провоспалительной способностью и играют решающую роль в иммунном старении. Естественные киллеры (NK) экспрессируют CD16, CD56 и CD57. У представителей группы ФОВ доля клеток CD56+CD57+ субпопуляции EM4 уменьшена на 62%, тогда как доля клеток CD56-CD57- субпопуляции pE1Tcyt (пре-эффекторы 1 типа) повышена на 11%. Снижение количества NK-клеток может способствовать нарушению иммунной регуляции у пожилых людей.

Суммарное количество эндотелиальных внеклеточных везикул (ЭВВ) в группе ФОВ в 1,9 раза выше контроля, что обусловлено главным образом повышением числа везикул с маркером CD133. Появление ЭВВ в циркулирующей крови связывают с воспалительным процессом, а повышенный уровень эндотелиальных прогениторов является одним из признаков атеросклеротического ремоделирования сосудов. Количество тетраспанинов CD63+ в группе ФОВ снижено в 3 раза, но на суммарное количество тетраспанинов эти изменения не влияют.

Из аналитических публикаций и собственных данных следует несколько выводов [1-3]: 1) ремоделирование эндотелия и сосудистая патология являются неотъемлемой составляющей т.н. возрастных заболеваний; 2) их спектр и интенсивность развития зависит от факторов генетической и эпигенетической природы; 3) ФОС-индуцированная патология и ее сосудистая составляющая являются самостоятельным эпигенетическим фактором, обусловливающим специфику, время возникновения и скорость развития возрастных заболеваний; 4) существуют специфические маркеры отставленной возрастной ФОС-индуцированной патологии.

2. Поиск новых маркеров для прогноза исхода коронавирусной инфекции. На первом этапе на малой выборке испытуемых (до 20 в каждой группе) определяли эстеразный статус и другие биохимические показатели плазмы крови здоровых людей молодого/среднего возраста, пожилых условно здоровых людей, выживших и не перенесших болезнь пациентов с COVID-19. Между группами молодых и пожилых здоровых испытуемых были обнаружены достоверные различия концентрации креатинина, общего белка, активности MDA и BChE по отношению к ATCh и BTCh, тогда как по уровню альбумина и мочевины между группами достоверных различий обнаружено не было. Значимые различия установлены по соотношениям активности BChE к [ALB] и к [MDA], а также по соотношению [Urea]×[MDA]/[ALB] и [Urea]×[MDA]/(BChEb × [ALB]). Сравнительный анализ эстеразного статуса практически здоровых людей пожилого возраста и пациентов того же возраста с COVID-19 позволил получить дополнительные доказательства значимости альбумина как диагностического маркера. Уровень альбумина у выживших и умерших больных был ниже соответственно на 18% и 27% относительно контроля, тогда как достоверные различия по общему белку были менее выражены. Уже ставший популярным в научной среде показатель с мочевиной и альбумином в нашем исследовании в группе выживших не отличался от контроля, хотя в группе умерших он был повышен примерно в четыре раза. Максимальные различия между группами были выявлены для индекса [Urea]×[MDA]×1000/(BChEb×[ALB]), который в группе умерших был в 10 раз выше, чем в группе выживших, и в 26 раз выше, чем в группе практически здоровых пожилых людей.

На заключительном этапе с учетом уже полученных результатов был проведен расширенный поиск новых диагностических индексов на большей группе пациентов с COVID-19 (77 выживших и 24 умерших). Установлено, что индекс (CK×[Urea])/[ALB] обладает наиболее высокой дискриминационной способностью для прогнозирования смертности от COVID-19 (AUC = 0.90, p = 0.0001; OR = 144, p = 0.0001). Более простой индекс [Urea]×10/[ALB] является достаточно хорошим предиктором смертности (AUC = 0.94, $p < 0.0001$; OR = 42.3, p = 0.001). Отмеченный ранее индекс [Urea]×[MDA]×1000/(BChEb×[ALB]) по показателям AUC и OR не превосходит индекс [Urea]×10/[ALB], притом что его получение значительно трудозатратнее из-за относительной сложности определения [MDA]. Таким образом, индексы CK×[Urea])/[ALB] и [Urea]×10/[ALB] могут быть рекомендованы для диагностических лабораторий, их расчет легко производится с помощью онлайн-калькулятора, для получения исходных данных достаточно провести биохимический анализ плазмы или сыворотки крови с помощью недорогих и доступных наборов. В

результате точность прогноза может быть существенно повышена, что позволит предотвратить смертельный исход заболевания у многих больных не только коронавирусной инфекцией, но и другими заболеваниями инфекционной природы, сопровождающимися острыми воспалительными процессами [4-7].

Интересно, что не было выявлено статистически значимых различий уровня креатинина между выжившими и умершими. Этот формально «отрицательный» результат представляется не менее важным, чем многие «положительные» результаты. В совокупности с повышенным уровнем мочевины у пациентов с COVID-19, эти данные указывают не столько на поражение почек, сколько на системное нарушение эндотелия у больных. Под воздействием бактериальных эндотоксинов и АФК профессиональных фагоцитов нарушается работа эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), которая вместо генерации оксида азота из L-аргинина начинает продуцировать супероксид-анион. Избыток аргинина служит субстратом для аргиназ I и II, которые гидролизуют его до орнитина и мочевины [8-11]. Повышение активности эндотелиальных аргиназ отмечено при COVID-19 [12]. Уровень ТБК-активных продуктов, включая MDA, характеризует влияние АФК на липиды, в плазме крови – преимущественно на ненасыщенные жирные кислоты. Снижение концентрации общего белка и альбумина, а также активности BChE и PON1 отражает нарушение белоксинтезирующей функции печени, а в случае PON1, которая синтезируется не только в печени, – нарушение её синтеза и в других органах, в том числе почках и поджелудочной железе. Тот факт, что различия между группами по уровню альбумина выражены в большей степени, чем по уровню общего белка, указывает на сохранение белоксинтезирующей функции печени в группе «умершие». Это свидетельствует о вероятном переключении этой функции на синтез CRP и других положительных острофазных белков, за счет чего снижается интенсивность синтеза альбумина, BChE и PON1. Повышение уровня и активности СК у пациентов в критическом состоянии связано с тем, что этот фермент попадает в кровь из скелетных мышц вследствие дрожательного термогенеза при фебрильной температуре.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-15-00155-П.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Avdonin P.V. Organophospate-Induced Pathology: Mechanisms of Development, Principles of Therapy and Features of Experimental Studies. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology,* 2023; 59(5):1756–1796.
2. Goncharov NV, Popova PI, Kudryavtsev IV, Golovkin AS, Savitskaya IV, Avdonin PP, Korf EA, Voitenko NG, Belinskaia DA, Serebryakova MK, Matveeva NV, Gerlakh NO, Anikievich NE, Gubatenko MA, Dobrylko IA, Trulioff AS, Aquino AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Immunological Profile and Markers of Endothelial Dysfunction in Elderly Patients with Cognitive Impairments. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(3):1888.
3. Goncharov N.V., P.I. Popova, A.D. Nadeev, D.A. Belinskaia, E.A. Korf and P.V. Avdonin. Endothelium, Aging, and Vascular Diseases. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2024; 60(6): 2191–2214
4. Belinskaia DA, Voronina PA, Popova PI, Voitenko NG, Shmurak VI, Vovk MA, Baranova TI, Batalova AA, Korf EA, Avdonin PV, Jenkins RO, Goncharov NV. Albumin Is a Component of the Esterase Status of Human Blood Plasma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(12):10383.
5. Goncharov NV, Avdonin PP, Voitenko NG, Voronina PA, Popova PI, Novozhilov AV, Blinova MS, Popkova VS, Belinskaia DA, Avdonin PV. Searching for New Biomarkers to Assess COVID-19 Patients: A Pilot Study. *Metabolites*. 2023; 13(12):1194.
6. Avdonin P.P., Markitantova Yu.V., Rybakova E.Yu., Goncharov N.V., and Avdonin P.V. Activation of Complement Factor C3/C3b Deposition on the of Endothelial Cell Surface by Histamine As one of the Causes of Endothelium Damage in COVID-19. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2023; 17: S51–S58.*
7. Belinskaia DA, Jenkins RO, Goncharov NV. Albumin Is an Integrative Protein of Blood Plasma and Beyond. *Int. J. Mol. Sci*. 2024; 25(23):12627.
8. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol*. 2013; 4:184.
9. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front. Immunol.* 2013; 4:111.
10. Elms S., Chen F., Wang Y., Qian J., Askari B., Yu Y., Pandey D., Iddings J., Caldwell R.B., Fulton D.J. Insights into the arginine paradox: Evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2013; 305: H.651-666.
11. Li Z., Wang L., Ren Y., Huang Y., Liu W., Lv Z., Qian L., Yu Y., Xiong Y. Arginase: Shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. *Cell Death Discov.* 2022; 8: 413.
12. Durante W. Targeting Arginine in COVID-19-Induced Immunopathology and Vasculopathy. *Metabolites.* 2022; 12: 240.

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ СЕМАГЛУТИДА И ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У САМЦОВ КРЫС С ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА

Деркач К.В.[1], Басова Н.Е.[1], Федорчук И.В.[1], Печальнова А.С.[1], Шпаков А.О.[1,2]

[1]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[2]Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Сахарный диабет 2 типа (СД2) – социально-значимое заболевание, которым в мире страдают до полумиллиарда человек. Фармакологические препараты, используемые для его лечения, не всегда эффективны и характеризуются множеством побочных эффектов, что в определенной степени характерно и для агонистов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), в том числе для семаглутида, одного из наиболее эффективных стимуляторов рецепторов ГПП-1. У пациентов с СД2 семаглутид нормализует первую и вторую фазу секреции инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы в крови, нормализует пищевое поведение и массу тела, положительно влияет на функции сердечно-сосудистой и нейроэндокринной систем [1,2]. Однако в сравнительно высоких фармакологических дозах семаглутид часто вызывает расстройства желудочно-кишечного тракта, нарушает пищевое поведение, реже приводит к гепатобилиарным расстройствам [3,4]. Снижение дозы семаглутида при сохранении его эффективности является перспективным подходом для предотвращения этих побочных эффектов и может быть достигнуто с использованием препаратов, повышающих ГПП-1-опосредуемый сигналинг в ЦНС и на периферии, среди которых важное место занимает интраназально вводимый инсулин (ИВИ). ИВИ, минуя гематоэнцефалический барьер, попадает в структуры мозга и, воздействуя на инсулиновую систему в гипоталамических нейронах, нормализует центральную регуляцию периферического метаболизма и глюкозного гомеостаза при СД2, восстанавливает интегративные связи между сигнальными системами мозга, включая ГПП-1-регулируемую систему [5]. Целью работы было сравнительное изучение эффектов совместного и раздельного введения семаглутида и ИВИ самцам крыс с СД2, который индуцировали длительной высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, на массу тела и жировой ткани, на метаболический статус и гормональные показатели животных.

Методика. Для экспериментов использовали самцов крыс Вистар (возраст 2 месяца), все процедуры с которыми проводили в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986, «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Для измерения уровней инсулина и лептина кровь отбирали из хвостовой вены под местным наркозом, для чего крысам вводили лидокаин (2-4 мг/кг). В конце эксперимента крыс декапитировали под общим наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг, в/б), забирая образцы крови для измерения уровня гликированного гемоглобина.

Модель СД2 вызывали с помощью высокожировой диеты (5-7 г смеси/сутки, содержащей 52.4% свиного сала, 41.7% творога, 5% печени, 0.5% L-метионина, 0.2% дрожжей и 0.2% NaCl), продолжительностью 15 недель, и однократной инъекции стрептозотоцина («Sigma-Aldrich», США) в дозе 15 мг/кг на 10-й неделе диеты, как описано ранее [6]. При этом животные диабетической группы сохраняли доступ к сухому гранулированному корму, который контрольные крысы потребляли в среднем по 20–25 г в сутки. Через 4 недели после инъекции стрептозотоцина (за неделю до обработки семаглутидом и ИВИ) крыс тестировали на маркеры СД2, отбирая животных с повышенной массой тела (на 10% по сравнению с контролем) и нарушенной толерантностью к глюкозе (уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки в оценочном глюкозотолерантном тесте (ГТТ) выше 7 мМ). Затем крыс с верифицированным СД2 рандомизировали на группы и лечили семаглутидом и(или) ИВИ. Формировали 7 групп (n=6): контроль (К), СД2 без обработки препаратами (Д), СД2 с обработкой семаглутидом (50 мкг/кг/сутки, подкожно) (ДС), ИВИ (0.5 и 2.0 МЕ/крысу/сутки) (ДИ0.5 и ДИ2) и совместно семаглутидом и ИВИ (ДСИ0.5, ДСИ2). Группы К и Д получали растворители препаратов. Второй (основной) ГТТ проводили за 3 дня до окончания эксперимента, для чего в/б вводили раствор глюкозы (2 г/кг), оценивая уровень глюкозы до (точка 0) и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после глюкозной нагрузки. Перед тестированием крыс лишали корма на 10 ч. Для кривых «концентрация глюкозы, мМ–время (мин)» рассчитывали показатель $AUC_{0\text{-}120}$, интегрированную площадь под глюкозными кривыми, выражая его в условных единицах. Концентрацию глюкозы оценивали с помощью тест-полосок «One Touch Ultra» («LifeScan Inc.», США) и глюкометра. Уровни инсулина и лептина в крови, которую отбирали до и через 120 мин после глюкозной нагрузки в ходе основного ГТТ, измеряли с помощью наборов «Rat Insulin ELISA kit» («Mercodia AB», Швеция) и «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США), соответственно. Содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови измеряли с помощью «Multi Test HbA1c System kit» («Polymer Technology Systems», США). Индекс инсулиновой резистентности (ИР)

рассчитывали, как простое произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови.

Статистическую обработку проводили с использованием «Microsoft Office Excel 2007». Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка. Для обработки данных с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Post hoc-анализ проводили с помощью теста Тьюки. Данные представляли как $M \pm SEM$. Для обработки данных с ненормальным распределением использовали непараметрический медианный тест. Для апостериорного анализа применяли тест Бонферрони. Для сравнения эффектов использовали H-тест Краскела–Уоллиса, для попарных сравнений – U-тест Манна–Уитни. Данные представляли, как медиану и межквартильный интервал (25%; 75%). Различия в обоих случаях считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Масса тела, масса жировой ткани и доля жировой ткани у крыс с СД2 были значимо выше, чем в контроле, и лечение семаглутидом снижало эти показатели, хотя они по-прежнему оставались выше, чем в контроле. ИВИ в обеих дозах на них существенно не влиял (табл. 1). При совместном применении семаглутида и ИВИ у СД2 крыс отмечали более выраженное снижение массы тела и жировой ткани и доли жира, причем в группе ДСИ0.5 эффект комбинированной терапии был выражен в большей степени, чем в группе ДС.

Табл. 1. Влияние четырехнедельного лечения крыс с СД2 семаглутидом, ИВИ и их комбинациями на массу тела, массу и долю жировой ткани

Группа	Масса тела, г	Масса жировой ткани, г	Доля жировой ткани, %
К	340.7 ± 7.2	7.1 (6.0; 8.6)	2.13 (1.81; 2.37)
Д	430.0 ± 13.2 [a]	20.9 (16.0; 25.5) [a]	4.83 (4.01; 5.54) [a]
ДС	384.5 ± 9.0 [a,b]	11.1 (9.8; 13.9) [a,b]	3.00 (2.62; 3.44) [a,b]
ДИ0.5	416.8 ± 9.2 [a]	19.0 (14.5; 20.4) [a]	4.39 (3.74; 4.84) [a]
ДИ2	408.8 ± 15.3 [a]	18.0 (12.6; 20.8) [a]	4.35 (3.44; 4.79) [a]
ДСИ0.5	355.8 ± 10.6 [b]	9.0 (7.1; 9.6) [b,c]	2.46 (2.14; 2.63) [b,c]
ДСИ2	357.0 ± 12.9 [b]	8.9 (6.7; 10.6) [b]	2.51 (2.00; 2.75) [b]

Примечание: Различия с контрольной ([a]) и диабетической ([b]) группами, а также между группами с обработкой семаглутидом и его комбинациями с ИВИ ([c]) статистически значимы при $p<0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, (нормальное распределение) и как межквартильные интервалы (ненормальное распределение), число животных равно 6.

У диабетических крыс отмечали повышение уровней глюкозы и содержания гликированного гемоглобина, а также значимое повышение показателя $AUC_{0\text{-}120}$ для глюкозных кривых в ГТТ (табл. 2), что указывает

на развитие гипергликемии и нарушенную толерантность к глюкозе. У крыс с СД2 были повышены стимулированный глюкозой уровень инсулина, индексы ИР и уровни лептина (табл. 3), что свидетельствует о развитии у них постпрандиальной гиперинсулинемии, выраженной ИР и гиперлептинемии.

Табл. 2. Влияние лечения самцов крыс с СД2 с помощью семаглутида, ИВИ и их комбинаций на глюкозный гомеостаз, оцениваемый по уровню глюкозы до (натощак) и через 120 мин после глюкозной нагрузки, показателю $AUC_{0\text{-}120}$ для глюкозных кривых в ГТТ и содержанию гликированного гемоглобина в крови.

Группа	Глюкоза-0, мМ	Глюкоза-120, мМ	$AUC_{0\text{-}120}$, отн.ед.	HbA1c, %
К	4.3 ± 0.2	5.2 ± 0.2	1220 (1099; 1247)	4.0 ± 0.1
Д	6.3 ± 0.3 [a]	8.2±0.4 [a]	1703 (1606; 1958) [a]	6.1±0.4 [a]
ДС	4.9±0.2 [b]	6.4±0.4 [b]	1315 (1229; 1500) [b]	5.1±0.1 [a,b]
ДИ0.5	5.7 ± 0.3 [a]	7.1±0.3 [a]	1574 (1411; 1674) [a]	5.7±0.2 [a]
ДИ2	5.6 ± 0.3 [a]	6.9±0.4 [a,b]	1322 (1099; 1848)	5.2±0.2 [a]
ДСИ0.5	4.5 ± 0.3 [b]	5.5±0.2 [b]	1177 (1107; 1322) [b]	4.7±0.2 [b]
ДСИ2	4.3 ± 0.2 [b]	5.1±0.3 [b,c]	1204 (1060; 1267) [b]	4.3±0.2 [b]

Примечание: Обозначения те же, что и в подписи к таблице 1.

Табл. 3. Влияние лечения крыс с СД2 семаглутидом, ИВИ и их комбинациями на уровни инсулина и лептина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки в ГТТ и на индексы ИР для этих временных точек

Группа	Инсулин-0, нг/мл	Инсулин-120, нг/мл	Индекс ИР-0, отн.ед.	Индекс ИР-120, отн.ед.	Лептин-0, нг/мл	Лептин-120, нг/мл
К	0.66±0.11	0.78±0.11	2.8±0.5	4.0±0.6	1.7±0.3	2.9 (2.1; 4.1)
Д	0.99±0.11	2.18±0.22[a]	7.8±1.2[a]	17.5±1.5[a]	3.1±0.4[a]	11.5 (7.2; 14.1)[a]
ДС	0.74±0.08	0.93±0.13[b]	3.5±0.3[b]	5.8±0.7[b]	1.9±0.3	4.9 (2.9; 6.4)[b]
ДИ0.5	0.58±0.10[b]	0.91±0.14[b]	3.2±0.5[b]	6.3±0.9[b]	2.6±0.2	6.4 (5.6; 9.0)[a]
ДИ2	0.46±0.06[b]	0.92±0.19[b]	2.5±0.3[b]	6.1±1.1[b]	2.6±0.3	7.1 (5.9; 7.7)[a,b]
ДСИ0.5	0.53±0.12[b]	0.92±0.16[b]	2.3±0.5[b]	5.0±0.8[b]	1.7±0.2[b]	4.3 (2.8; 5.3)[b]
ДСИ2	0.47±0.09[b]	0.68±0.09[b]	2.0±0.4[b]	3.4±0.3[b]	1.7±0.3[b]	3.9 (2.7; 4.9)[b]

Примечание: Обозначения те же, что и в подписи к таблице 1.

Терапия семаглутидом вызывала нормализацию уровней глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина и лептина, толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину (табл. 2, 3), в то время как терапия

ИВИ восстанавливала чувствительность к инсулину, снижая уровни инсулина и индекс ИР, а в группе ДСИ2 также снижая стимулированный глюкозой уровень лептина (табл. 3). Комбинированное применение семаглутида и ИВИ было более эффективным в отношении восстановления глюкозного гомеостаза и чувствительности к инсулину и лептину, но значимые различия с группой ДС имелись только в группе ДСИ2, где уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки, содержание HbA1c в крови и индексы ИР были ниже, чем в группе ДС (табл. 2, 3).

Тем самым, одним из подходов для повышения эффективности семаглутида, расширения спектра его терапевтического действия и снижения эффективной дозы может стать его комбинированное применение с ИВИ, который не только наделен нейропротекторным эффектом, предотвращая когнитивный дефицит при нейродегенеративных заболеваниях и СД2, но также способен восстанавливать ключевые метаболические и гормональные показатели, нарушенные при диабетической патологии, и улучшать ГПП-1-опосредуемый сигналинг в ЦНС и на периферии. В проведенном исследовании нами установлено, что совместное использование семаглутида (50 мкг/кг/сутки) и ИВИ (0.5 и 2.0 МЕ/крыса/сутки) в значительной степени нормализует массу тела и жира, глюкозный гомеостаз, инсулиновую чувствительность, ослабляет гиперлептинемию. Важно, что комбинированное применение семаглутида и ИВИ превосходит монотерапию семаглутидом по целому ряду показателей. Так в сравнении с монотерапией семаглутидом в группе с введением семаглутида и ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крысу отмечали более эффективное снижение массы жира, а в группе с введением семаглутида и ИВИ в дозе 2.0 МЕ/крысу отмечали более эффективное восстановление уровней глюкозы и гликированного гемоглобина в крови и более выраженное улучшение чувствительности к инсулину. Эти данные являются первым свидетельством о перспективности совместного применения семаглутида и ИВИ при диета-индуцированном СД2.

Работа поддержана госзаданием ИЭФБ РАН № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aroda VR, Ahmann A, Cariou B, et al. Comparative efficacy, safety, and cardiovascular outcomes with once-weekly subcutaneous semaglutide in the treatment of type 2 diabetes: Insights from the SUSTAIN 1-7 trials. *Diabetes Metab*. 2019;45:409-418.

2. Gibbons C, Blundell J, Tetens Hoff S, et al. Effects of oral semaglutide on energy intake, food preference, appetite, control of eating and body weight in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2021;23:581-588.

3. Tan HC, Dampil OA, Marquez MM. Efficacy and Safety of Semaglutide for Weight Loss in Obesity Without Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J ASEAN Fed Endocr Soc*. 2022;37:65-72.
4. Feier CVI, Vonica RC, Faur AM, et al. Assessment of Thyroid Carcinogenic Risk and Safety Profile of GLP1-RA Semaglutide (Ozempic) Therapy for Diabetes Mellitus and Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2024;25:4346.
5. Shpakov AO, Zorina II, Derkach KV. Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium. *Int J Mol Sci*. 2023;24:3278.
6. Derkach KV, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, et al. Effect of a Low-Molecular-Weight Allosteric Agonist of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor on Basal and Thyroliberin-Stimulated Activity of Thyroid System in Diabetic Rats. Int J Mol Sci. 2025;26:703.

VBIT-4 СНИЖАЕТ КАЛЬЦИЕВУЮ ПЕРЕГРУЗКУ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ДИСТРОФИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ DMDDEL8-34/DBA И СПОСОБСТВУЕТ УСТРАНЕНИЮ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ КАЛЬПАИНОВ

Дубинин М.В.[1], Семенова А.А.[1], Черепанова А.А.[1], Устинова А.С.[1], Хорошавина Е.И.[1], Поликарпова А.В.[2], Логинов В.А.[2], Егорова Т.В.[2]

[1]Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия
[2]Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Введение. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой наследственное Х-сцепленное рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене, кодирующем белок дистрофин. Этот структурный белок, расположенный на внутренней поверхности сарколеммы, обеспечивает связь актинового цитоскелета мышечного волокна с внеклеточным матриксом через дистрогликановый комплекс. Дефицит дистрофина провоцирует микроповреждения мембраны при сокращениях, что вызывает патологическую инфильтрацию Ca^{2+} в цитозоль. Стойкая гиперкальциемия активирует кальпаины — кальций-зависимые протеазы, запускающие деградацию внутриклеточных белков. Это приводит к протеолизу структурных элементов, окислительному стрессу, некрозу мышечных волокон и вторичному воспалению [1].

Избыток кальция, возникающий в дистрофин-дефицитном мышечном волокне, также приводит к чрезмерному накоплению этого иона в митохондриях. Это способствует нарушению функции электрон-транспортной цепи, усиленной продукции активных форм кислорода (АФК) и открытию митохондриальной поры (МРТ-поры), запускающей различные варианты клеточной гибели [1]. Экспериментальные модели показали, что блокада митохондриальной кальциевой перегрузки и ингибирование МРТ-поры улучшают функцию органелл и морфофункциональные показатели скелетных мышц [1,2]. Это обосновывает стратегию таргетной коррекции кальциевой сигнализации при отсутствии эффективной генетической терапии. Ранее в модели диабета было показано, что модуляция митохондриального кальциевого гомеостаза посредством ингибирования поринового канала внешней мембраны митохондрий (VDAC) может способствовать устранению дисфункции митохондрий и замедлять развитие патологии [3]. В настоящей работе нами изучено *in vivo* влияние VBIT-4 (ингибитор VDAC) на состояние скелетной мускулатуры и функцию митохондрий у мышей линии DmdDel8-34/DBA с тяжелым фенотипом МДД.

Методы исследования. В эксперименте были использованы дистрофин-дефицитные мыши линии DmdDel8-34/DBA (Dmd мыши). Для этого гомозиготных самок DMDdel8-34, полученных ранее методом редактирования генома CRISPR-Cas9 и демонстрирующих мягкий фенотип патологии МДД [4], скрещивали с самцами линии DBA/2. Полученное поколение принимали за F0. Для полученного потомства проводили четыре возвратных скрещивания с мышами линии DBA/2. Представленное исследование было проведено на самцах F4. В качестве контрольной группы использовали самцов мышей линии DBA/2. Животные были случайным образом разделены на четыре группы: DBA/2 (n = 6), DBA/2 + VBIT-4 (n = 6), Dmd (n = 6) и Dmd + VBIT-4 (n = 6). VBIT-4 вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг через день в течение четырех недель. По окончании эксперимента была произведена оценка физической силы и выносливости мышей в соответствии с общепринятыми протоколами (тест удержания животного на струне и тест силы хвата) [2]. Кроме того, из ткани скелетной мускулатуры экспериментальных групп мышей были выделены митохондрии, для чего применялся общепринятый метод дифференциального центрифугирования. В ходе эксперимента оценивалось содержание ионов кальция в митохондриях скелетных мышц с помощью флуоресцентного зонда Calcium Green-5 N и канал-образующего агента аламетицина [5]. В экстрактах ткани и изолированных митохондрий флуориметрически оценивалась активность кальпаинов.

Результаты. Ранее было показано, что модуляция VDAC-каналов митохондрий с помощью VBIT-4 оказывает влияние на кальциевый гомеостаз в органеллах и увеличивает устойчивость митохондрий к индукции кальций-зависимой MPT-поры [3]. Для дистрофин-дефицитных мышц характерно состояние хронической кальциевой перегрузки, что также сопровождается избыточным накоплением этого иона в матриксе митохондрий, способствующим развитию дисфункции органелл. Действительно, можно видеть, что внесение известного канал-образующего агента аламетицина к суспензии митохондрий скелетных мышц Dmd мышей приводит к существенному, по сравнению с контролем (группа DBA/2), увеличению интенсивности флуоресценции зонда Calcium Green-5 N, что свидетельствует о высвобождении значительного количества ионов кальция из органелл (рис. 1). При этом митохондрии дистрофин-дефицитных животных, получавших VBIT-4, характеризуются снижением интенсивности флуоресценции Calcium Green-5 N, что может отражать уменьшение кальциевой перегрузки органелл.

Одним из последствий повышения уровня ионов кальция в дистрофин-дефицитных мышцах является неконтролируемая активация Ca^{2+}-зависимых протеаз (кальпаинов), способствующая развитию протеотоксического стресса [1]. При этом известно, что митохондрии

также содержат фракцию кальпаинов, активность которых зависит от уровня ионов кальция в матриксе органелл, и их избыточная активация приводит к нарушению функции белков этих органелл и митохондриальной дисфункции [6]. Активность митохондриальной фракции кальпаинов значительно повышена у Dmd мышей, и в этом случае VBIT-4 способствовал достоверному снижению этого параметра (рис. 2А), что может быть обусловлено снижением кальциевой перегрузки матрикса органелл. Более того, можно видеть, что такой эффект VBIT-4 также сопровождается достоверным снижением общей активности кальпаинов, экстрагированных из четырехглавой мышцы бедра Dmd мышей (рис. 2Б). Это, предположительно, обусловлено как ингибированием активности митохондриальной фракции кальпаинов, так и некоторым устранением избытка кальция в цитоплазме дистрофин-дефицитных мышц вследствие сохранения большего количества функциональных митохондрий, способных аккумулировать ионы кальция.

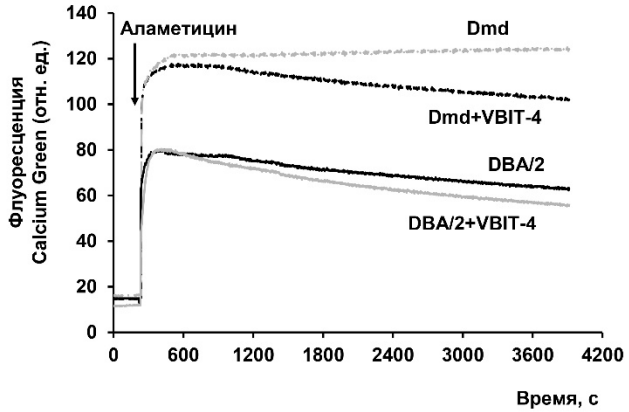


Рис. 1. Оценка кальциевой перегрузки митохондрий скелетных мышц мышей. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты получены еще в трех независимых экспериментах.

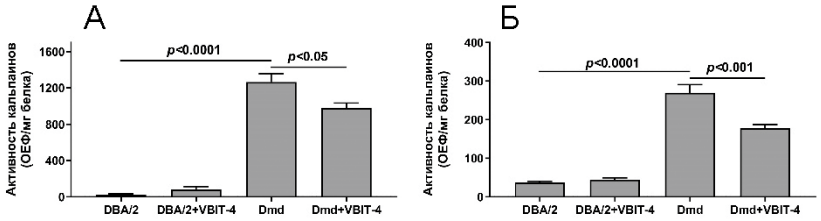


Рис. 2. Активность кальпаинов в экстрактах изолированных митохондрий (А) и четырехглавой мышцы бедра (Б). Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4-5).

Нами оценено, могут ли митохондриальные эффекты VBIT-4 влиять на функциональное состояние скелетных мышц дистрофин-дефицитных животных. Dmd мыши характеризуются низкой способностью удерживаться на горизонтальной перекладине, а также низкими значениями силы хвата по сравнению с мышами линии DBA/2 (рис. 3А и Б). Все это свидетельствует об угнетении мышечной функции дистрофин-дефицитных мышей. VBIT-4 способствовал увеличению силы хвата Dmd мышей, но не оказал влияния на способность животных удерживаться на перекладине. Это свидетельствует об ограниченном эффекте VBIT-4 на мышечную силу и выносливость дистрофин-дефицитных животных.

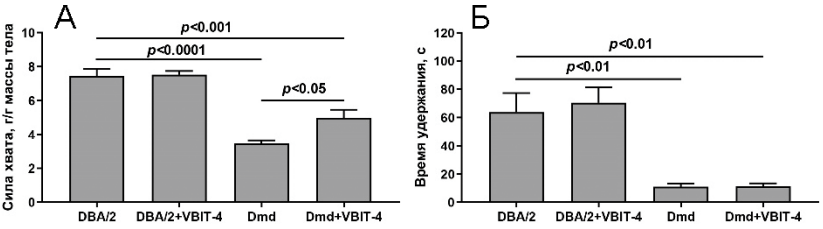


Рис. 3. Результаты физиологических тестов: тест силы хвата (А), тест на струне (Б). Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 6).

Исходя из полученных результатов, можно полагать, что VBIT-4 проявляет митопротекторные свойства, предотвращая избыточное накопление ионов кальция в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей и снижая активность кальпаинов как в митохондриях, так и в мышечной ткани. Тем не менее, такого эффекта недостаточно для существенного улучшения качества жизни экспериментальных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-75-10006.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubinin MV, Belosludtsev KN. Ion channels of the sarcolemma and intracellular organelles in Duchenne muscular dystrophy: a role in the dysregulation of ion homeostasis and a possible target for therapy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2229.
2. Dubinin MV, Stepanova AE, Mikheeva IB, Igoshkina AD, Cherepanova AA, Talanov EY, Khoroshavina EI, Belosludtsev KN. Reduction of mitochondrial calcium overload via MKT077-induced inhibition of glucose-regulated protein 75 alleviates skeletal muscle pathology in dystrophin-deficient mdx mice. *Int J Mol Sci*. 2024;25(18):9892.
3. Belosludtsev KN, Serov DA, Ilzorkina AI, Starinets VS, Dubinin MV, Talanov EY, Karagyaur MN, Primak AL, Belosludtseva NV. Pharmacological and genetic suppression of VDAC1 alleviates the development of mitochondrial dysfunction in endothelial and fibroblast cell cultures upon hyperglycemic conditions. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(7):1459.
4. Egorova TV, Zotova ED, Reshetov DA, Polikarpova AV, Vassilieva SG, Vlodavets DV, Gavrilov AA, Ulianov SV, Buchman VL, Deykin AV. CRISPR/Cas9-generated mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb deletion in the human *DMD* gene. *Dis Model Mech*. 2019;12(4):dmm037655.
5. Bround MJ, Havens JR, York AJ, Sargent MA, Karch J, Molkentin JD. ANT-dependent MPTP underlies necrotic myofiber death in muscular dystrophy. *Sci Adv*. 2023;9(34):eadi2767.
6. Zhang M, Wang G, Peng T. Calpain-Mediated Mitochondrial Damage: An Emerging Mechanism Contributing to Cardiac Disease. *Cells*. 2021;10(8):2024.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

Иванова В.П.

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

Бездумное использование традиционных антибиотиков в медицинской практике для лечения любых инфекционных заболеваний у человека привело к появлению и распространению болезнетворных антибиотико-устойчивых микроорганизмов. Поэтому разработка новых терапевтических препаратов с антимикробной активностью остается архиважной задачей. В этой связи все большее внимание уделяется анализу природных и синтетических антимикробных пептидов (АМП) в качестве перспективных лекарственных препаратов.

Строение антимикробных пептидов. В настоящее время известно около 3 тысяч АМП, которые обнаружены у животных, растений, грибов и микроорганизмов [1]. АМП из бактерий и грибов относятся к пептидам, синтезируемым на мультиферментных комплексах (так называемые нерибосомальные пептиды). Пептиды эукариот без исключения транслируются на рибосомах.

Большинство АМП являются катионными пептидами, длина аминокислотной последовательности которых не превышает 50 аминокислот. Благодаря высокому содержанию основных аминокислотных остатков (Lys, Arg, His), АМП заряжены положительно (от +2 до +9). Это обеспечивает возможность образования электростатических связей между пептидами и отрицательно заряженными мембранами микроорганизмов.

АМП представляют собой амфипатические соединения, в которых гидрофильная часть, содержащая аминокислоты Gly, His, Arg, Asp, отделена от гидрофобного сегмента с преобладанием аминокислот Leu, Ile, Met, Ala. Чаще гидрофобный сегмент локализуется в С-концевой части АМП. Подобное структурирование пептида обеспечивает лучшее проникновение и встраивание АМП в мембрану бактерий.

Большое разнообразие первичных структур АМП определяет различные способы укладки вторичной структуры у этих соединений (α-спираль, β-листы, αβ-смешанные структуры, линейные вытянутые структуры) (Рис. 1). Вторичная структура не фиксирована и формируется в момент контакта молекулы АМП с бактериальной клеткой [2].

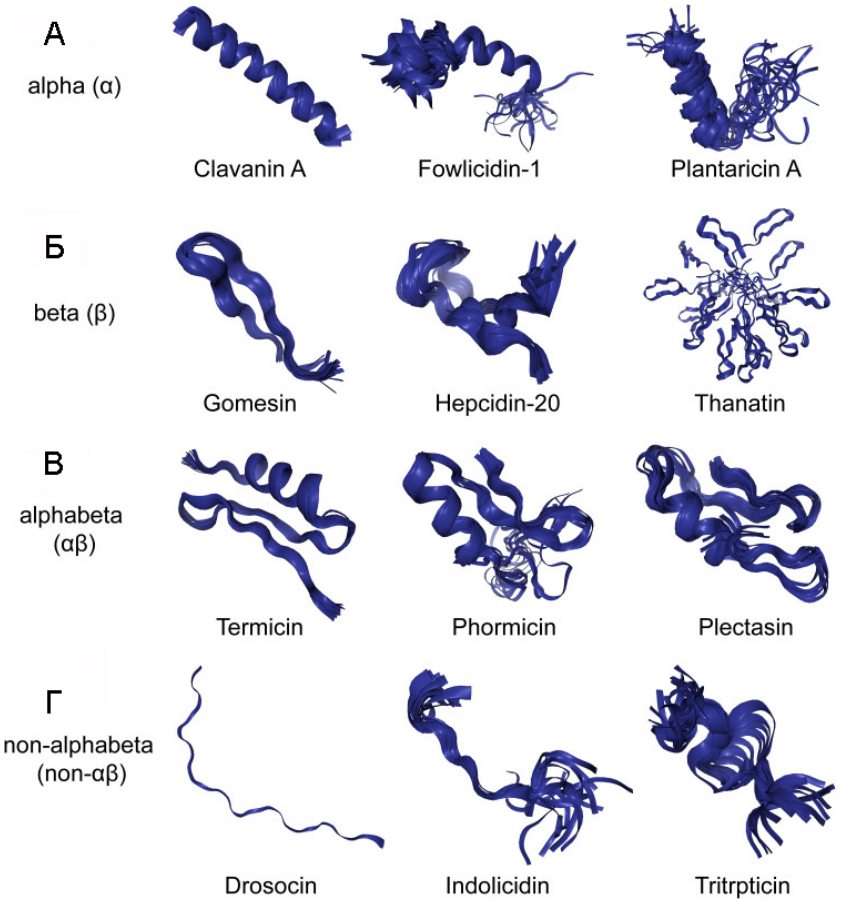


Рис. 1. Вторичная структура некоторых представителей антимикробных пептидов А – α-спиральные АМП, Б – β-складчатые АМП, В – АМП со смешанной α- и β-структурами, Г – АМП с линейными вытянутыми структурами. (Приводится по [2]).

Механизмы действия антимикробных пептидов. АМП могут проявлять свою функциональную активность или за счет разрушения бактериальной мембраны (мембранотропное действие), или за счет повреждения компонентов, локализованных внутри бактерий (внутрибактериальное действие).

Все катионные АМП при первичном контакте с бактериями адсорбируются на поверхности клетки за счет электростатических связей

между катионными зонами АМП и отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов бактериальных мембран [1,3]. Первичный контакт молекул АМП с мембранами микроорганизмов обеспечивает структурирование АМП, т.е. пептиды приобретают α-спиральную или β-складчатую структуру, которая способствует встраиванию АМП в бактериальную мембрану. Этот процесс завершается формированием пороподобных структур.

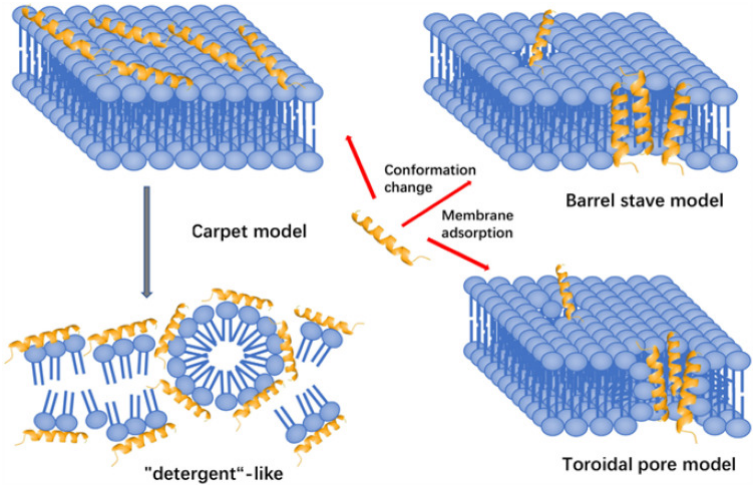


Рис. 2. Существующие модели взаимодействия антимикробных пептидов с бактериальной мембраной (Приводится по [2]).

В зависимости от способа взаимодействия АМП с липидным матриксом бактериальной мембраны предложены 4-ре модели воздействия пептидов на мембрану (Рис. 2) [2,3]. Согласно модели *«сборки бочки»* (the barrel-stave model) АМП образуют трансмембранные каналы без их связывания с молекулами фосфолипидов. При этом гидрофобные домены АМП ориентированы к гидрофобной зоне бактериальной мембраны, а гидрофильные области образуют внутреннюю поверхность трансмембранной поры. Модель *«тороидной поры»* (the toroidal pore model) отличается от предыдущей модели наличием постоянных связей АМП с липидным бислоем бактериальной мембраны. Пептид, встраиваясь в мембрану бактерий, вызывает растяжение и изгибание липидного бислоя внутрь мембраны, которое завершается формированием канала. В отличие от упомянутых выше моделей, в модели *«ковра»* (the carpet model) АМП не встраиваются в бактериальную мембрану. Молекулы АМП накапливаются на поверхности мембраны, покрывая отдельные ее

участки, подобно ковру. При достижении критической концентрации АМП происходит дезинтеграция мембраны на отдельных участках с формированием мицелл, приводящих к распаду мембраны. Согласно *«агрегатной»* модели (the aggregate/detergent-like model) АМП не только нарушают целостность бактериальной мембраны, но и обеспечивают транспортировку АМП внутрь объекта. Молекулы АМП действуют подобно детергентам, образуя комплексы с молекулами липидов, которые удаляются в виде агрегатов, создавая многочисленные перфорации в мембране.

Некоторые АМП, не обладая мембранотропной активностью, после транслокации через мембрану во внутреннее пространство микроорганизмов воздействуют на внутрибактериальные мишени. АМП, связываясь с нуклеиновыми кислотами или белками, могут блокировать репликацию, транскрипцию и трансляцию или изменять функции ферментативных систем, нарушать клеточный цикл и энергетический метаболизм бактерий.

Существующие подходы для молекулярной модификации антимикробных пептидов. Основная задача структурной модификации АМП заключается в создании новых пептидных молекул, которые бы обеспечили усиление антимикробной активности соединений, уменьшение токсичности АМП в отношении клеток млекопитающих и исключение возможности приобретения микроорганизмами устойчивости к АМП [4].

Химическая модификация АМП включает замещение некоторых аминокислотных остатков в последовательности пептида, циклизацию пептидов и некоторые др.

Используя различные аминокислотные замены можно изменить физико-химические свойства, вторичную структуру и антимикробную активность пептида. Введение дополнительных основных аминокислотных остатков в последовательность пептида увеличивает катионные свойства АМП и его связывающую с мембраной активность. Включение дополнительных гидрофобных аминокислот усиливает проникновение АМП в трансмембранную зону бактериальной мембраны. Включение D-изомеров природных аминокислот способствует стабилизации АМП и его устойчивости к действию протеаз.

Посттрансляционная модификация АМП влияет на образование вторичной структуры и на стабильность пептида. Наиболее часто используется С-концевая модификация (амидирование) и N-концевые модификации (ацетилирование, метилирование и некоторые др.). Подобные изменения последовательности АМП защищают соединения от ферментативного расщепления и усиливают их антимикробную активность.

Циклизация, как известно, сводится к трансформации линейного пептида в циклическую форму. Последняя придает пептидам стабильность и устойчивость к действию протеаз. Циклические пептиды получают с помощью образования или дисульфидных связей между остатками Cys, или бета-лактамных мостиков между N- и C-концевыми аминокислотами пептида. Более высокая эффективность действия циклических пептидов по сравнению с соответствующими линейными аналогами обусловлена более компактной формой ц-АМП.

В последнее время все большее внимание уделяется использованию наночастиц различного происхождения для включения в эти образования молекул АМП для транспортировки пептидов к клеткам-мишеням. В качестве наночастиц могут использоваться как неорганические компоненты, так и органические полимерные материалы (в виде мицелл, дендримеров, нанотрубок, нанофибрилл и др.).

Заключение. Возрастающий объем информации о строении и свойствах АМП требует формулирования новых подходов для создания объемной классификационной системы, описывающей все уровни структурной организации АМП с выходом на биологическую активность (противомикробную, цитотоксическую и др.).

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhu Y., Hao W., Wang X. et al. // *Med. Res. Rev.* 2022; 42: 1377-1422.
2. Huang X., Li G. // *Infect. Drug Resist*. 2022; 16: 1203-1219.
3. Ma X., Wang Q., Ren K. et al. // *Fermentation.* 2024; 10: 540.
4. Mwangi J., Kamau M., Thuku R.G. et al. // *Zool. Res.* 2023; 44: 1095-1114.

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПАННЕКСИНА 1 НА СОКРАЩЕНИЕ АРТЕРИЙ БРЫЖЕЙКИ МЫШИ ПРИ ПЕРЕВЯЗКЕ ОБЩЕГО ЖЕЛЧНОГО ПРОТОКА

Кирюхина О.О.[1], Печкова М.Г.[1,2], Тарасова О.С.[2,3]

[1]ИППИ им А.А. Харкевича, РАН, Москва, Россия
[2]ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, Россия
[3]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Паннексин 1 (Panx1) – трансмембранный белок, формирующий канал для выхода АТФ в межклеточное пространство [1] и вовлеченный во многие физиологические и патологические процессы [2]. Недавно было показано, что токсическое повреждение печени уже через несколько часов приводит к значительному увеличению содержания мРНК *Panx1*, а нокаут этого гена облегчает клинические проявления хронической печеночной недостаточности в модели неалкогольного стеатогепатита [3].

Одним из осложнений цирроза и других хронических заболеваний печени является портальная гипертензия - стойкое повышение давления в портальной вене, что вызывает изменения в сосудах, обеспечивающих кровоснабжение печени, а также в других сосудах чревной области. При портальной гипертензии происходит повышение чревного кровотока, что обусловлено изменением функции эндотелия сосудов и, следовательно, реактивности сосудов на констрикторные и дилататорные влияния [4].

Ранее было показано, что Panx1 участвует в регуляции функциональной активности гладкомышечных и эндотелиальных клеток артериальных сосудов [5-6]. Однако роль Panx1 в регуляции тонуса сосудов чревной области при заболеваниях печени ранее не исследовалась. Целью данной работы стало выявление роли Panx1 в регуляции тонуса артерий брыжейки мыши при портальной гипертензии, вызванной перевязкой общего желчного протока.

Методика. В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6J (дикий тип, WT) и линии с глобальным нокаутом гена *Panx1* (KO) [7], возраст животных в начале эксперимента составлял 11-15 недель. Мышей содержали в стандартных условиях вивария кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова при световом цикле 12/12 ч, температуре 22-25°C и свободном доступе к питьевой воде и корму. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Этическим комитетом ИППИ РАН (протокол заседания № 2 от 14.11.2023).

Для каждой линии было сформировано две группы мышей, у одной их которых моделировали портальную гипертензию путем лигирования общего желчного протока (ЛЖП), а у второй проводили ложную операцию (ЛО). Через три недели животных подвергали эвтаназии, взвешивали печень и почки, собирали кровь для биохимических исследований, выделяли артерии брыжейки для исследования в изометрическом миографе и анализа экспрессии генов методом количественной ПЦР

Анализ биохимических показателей крови. Собранную в пробирки кровь 20 мин держали при 20-25ºС, затем 50 мин при 4ºС. Далее образцы центрифугировали 15 мин при 1358 g (Eppendorf Minispin), отбирали сыворотку и хранили при минус 20ºС до проведения анализов. Использовали наборы реагентов от ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия) и ООО «Хоспитекс Диагностикс» (Россия).

Исследование сократительной активности артерий брыжейки. Из сосудистого русла брыжейки выделяли мелкие артерии (первый порядок ветвления верхней брыжеечной артерии) и вырезали из них кольцевые сегменты длиной 2 мм, которые помещали в камеры изометрического миографа (Multi Myograph System 620M, DMT, Дания). Показания датчиков силы оцифровывали с частотой 10 Гц и регистрировали на компьютере с использованием аналого-цифрового преобразователя E14-140 (L-Card, Россия) и программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

В ходе эксперимента камеры миографа были заполнены раствором следующего состава (мМ): NaCl 120; NaHCO3 26; KCl 4.5; CaCl2 1.6; MgSO4 1.0; NaH2PO4 1.2; D-глюкоза 5.5; EDTA 0.025; HEPES 5.0, аэрация 5% CO2 + 95% O2, pH 7.4, температура 37°C. В начале каждого эксперимента определяли растяжение, оптимальное для сокращения препарата [8] и активировали препарат с помощью KCl (60 мМ) и фенилэфрина (агонист α_1-адренорецепторов, 10 мкМ). После каждого воздействия проводили отмывку путем пятикратной смены раствора в камере в течение 10 мин; промежуток времени между окончанием отмывки и следующим воздействием составлял не менее 5 мин. В основной части протокола тестировали ответы артерий на АТФ (100 мкМ) и фенилэфрин (кумулятивно в диапазоне от 0.01 до 30 мкМ, 3 мин в каждой концентрации). Все фармакологические препараты были получены из фирмы Sigma-Aldrich (США).

Обработку результатов проводили в программах PowerGraph 3.3 и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Сначала из значений силы до и при добавлении вазоактивных веществ вычитали значение силы, соответствующее полному расслаблению гладкой мышцы препарата (в присутствии 10 мкМ DEA/NO (донор NO) и 2 мМ EGTA). Для фенилэфрина такое значение силы определяли при действии каждой из концентраций, для АТФ – значения силы усредняли за 2.5 мин от начала

реакции. Полученные значения силы сокращения нормировали на удвоенную длину сегмента [8]. Кроме того, вычисляли площадь под кривой зависимости доза-эффект на фенилэфрин.

Исследование экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. Каждый образец содержал 2-3 артерии брыжейки одной мыши. Выделение РНК проводили с помощью набора Clean RNA Standard (Евроген, Россия). После измерения концентрации РНК (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США) ее выравнивали между всеми образцами, затем образцы обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) и синтезировали кДНК с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в приборе ДТлайт (ДНК-Технология, Россия) с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия).

Оценивали содержание мРНК генов трёх типов паннексина (*Panx1*; *Panx2*; *Panx3*) и эктонуклеотидазы NTPDase 1 (*Entpd1, CD39*). В качестве референсного использовали ген белка SM22 (*Tagln*). В программе RealTime_PCR (ДНК-Технология, Россия) определяли значения Ср и далее рассчитывали значения уровня экспрессии (А): A=E^(−Cp), где E – эффективность праймеров. Полученное значение нормировали на значение экспрессии референсного гена в том же образце.

Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Нормальность выборок оценивали в тесте Шапиро-Уилка. В тексте и в таблице данные приведены как среднее и стандартное отклонение, на графиках – как среднее и стандартная ошибка. Использовали непарный t-тест Стьюдента при сравнении двух групп, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака при сравнении четырех групп, двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака для дозозависимых реакций. Различия считали значимыми при $p < 0.05$; n – количество животных в группе.

Результаты. Масса тела мышей в четырех группах в начале эксперимента не различалась, однако через три недели после операции в обеих группах ЛЖП она была ниже, чем в соответствующих группах ЛО, различия между линиями не наблюдались (табл. 1). Масса печени была в равной степени увеличена в группах WT-ЛЖП и KO-ЛЖП (табл.1). Интересно, что в группе KO-ЛО масса печени была меньше, чем в группе WT-ЛО (табл. 1). Уровни маркеров повреждения печени (общего и прямого билирубина, АЛТ, щелочной фосфатазы и общего холестерина) были выше в группах WT-ЛЖП и KO-ЛЖП, чем в группах ЛО. Известно, что одним из негативных последствий портальной гипертензии является повреждение почек [4]. У обеих линий мышей в результате ЛЖП наблюдалось увеличение массы почек, между линиями значения не

различались (табл. 1). Кроме того, уровень мочевины в группах WT-ЛЖП и КО-ЛЖП был повышен, что говорит о влиянии ЛЖП на экскреторную функцию почек.

Табл. 1. Масса тела и органов у четырех групп мышей.

Показатели	Группы мышей			
	WT-ЛО (n=10)	WT-ЛЖП (n=9)	КО-ЛО (n=12)	КО-ЛЖП (n=11)
Масса тела до операции, г	26.6 ± 2.3	26.2 ± 1.5	26.7 ± 2.4	27.6 ± 4.4
Масса тела при забое, г	26.0 ± 2.3	20.2 ± 1.9 *	27.1 ± 2.4	20.3 ± 4.3 *
Масса печени, % массы тела	6.17 ± 0.57	6.93 ± 0.54 *	5.54 ± 0.39 #	6.97 ± 0.76 *
Масса почек, % массы тела	0.55 ± 0.09	0.84 ± 0.14 *	0.55 ± 0.04	0.83 ± 0.14*

Примечания. * – $p < 0.05$ для ЛЖП по сравнению с ЛО внутри одной линии мышей; # – $p < 0.05$ для КО-ЛО по сравнению с WT-ЛО и WT-ЛЖП (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака).

Сократительные ответы артерий брыжейки на агонист α_1-адренорецепторов фенилэфрин у мышей КО не были изменены по сравнению с WT как после ЛО (рис. 1А), так и после ЛЖП (рис. 1Б). Вместе с тем содержание мРНК *Panx1* в ткани артерий у WT-ЛЖП было вдвое выше, чем у WT-ЛО: $(5.72\pm2.79)\times10^{-4}$ (n=9) и $(2.67\pm0.71)\times10^{-4}$ (n=9) соответственно (p=0.006). Экспрессии *Panx1* в артериях КО, а также *Panx2* и *Panx3* в артериях обеих линий мышей выявлено не было.

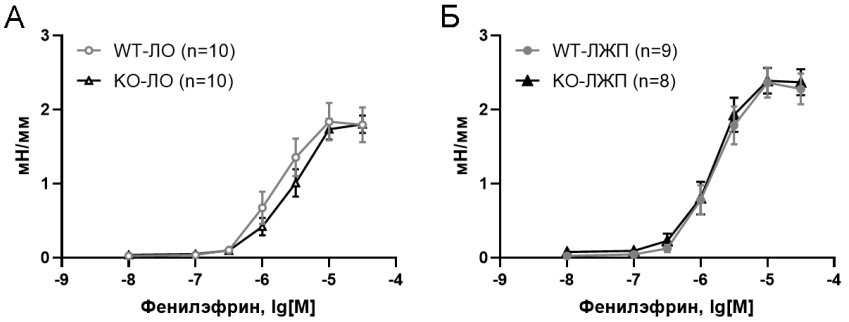


Рис. 1. Сократительные ответы артерий брыжейки на фенилэфрин у мышей двух линий после проведения ЛО (А) и ЛЖП (Б).

Однако ЛЖП неодинаково влияла на реакции сокращения артерий у двух линий мышей. У WT реакции на фенилэфрин после ЛЖП не изменялись (рис. 2А), но были увеличенными у КО (рис. 2Б). АТФ вызывал быстрый сократительный ответ, который постепенно спадал в течение 3-5 мин. Как и в случае фенилэфрина, реакции на АТФ после ЛО и ЛЖП не различались у WT (рис. 2В), но увеличивались у КО (рис. 2Г).

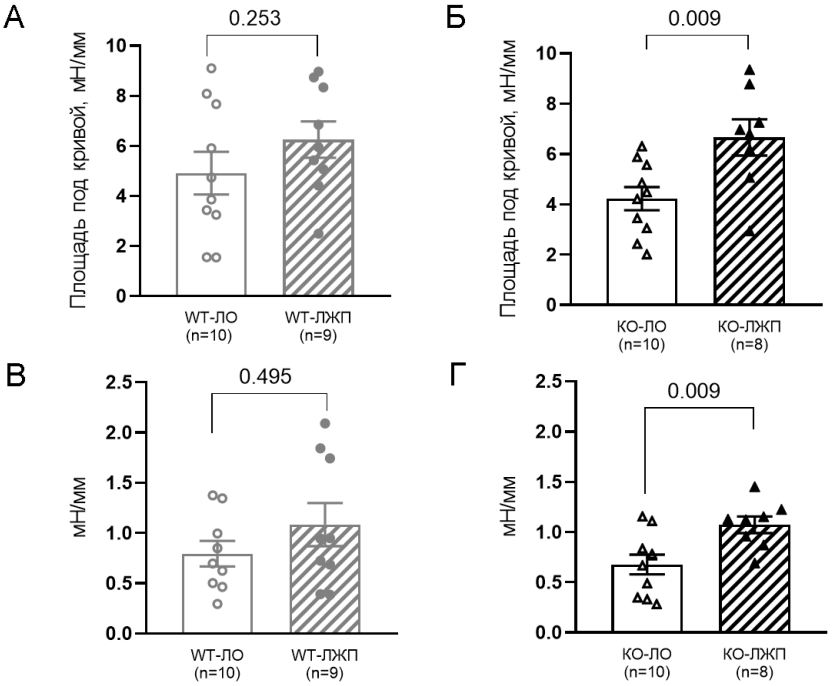


Рис. 2. Влияние перевязки желчного протока на сократительные ответы артерий брыжейки на фенилэфрин (А-Б) и АТФ (В-Г) у двух линий мышей.

Важную роль в регуляции тонуса сосудов играют эктонуклеотидазы, прежде всего NTPDase 1. Содержание мРНК NTPDase 1 не различалось в группах WT-ЛО (0.028±0.008, n=10) и WT-ЛЖП (0.032±0.005, n=8), но было увеличено у КО-ЛЖП (0.037±0.008, n=8) по сравнению с КО-ЛО (0.029±0.004, n=8, p=0.043).

Заключение. Активность каналов Panx1 часто связывают с развитием патологических состояний [2]. При заболеваниях печени экспрессия Panx1 в печеночной ткани многократно растет, а нокаут гена Panx1 может сглаживать развитие патологии [3]. В нашей модели

портальной гипертензии, основанной на перевязке общего желчного протока, экспрессия гена *Panx1* в артериях брыжейки мышей WT значительно увеличивалась, однако анализ вазомоторных реакциях артерий брыжейки показал, что сократительные ответы на фенилэфрин и экзогенный АТФ, потенциально связанные с активностью каналов паннексина 1, у мышей WT не изменяются в результате ЛЖП. Вместе с тем реакции на оба вазоконстриктора увеличивались после ЛЖП у мышей KO, как и содержание мРНК NTPDase 1, одного из основных ферментов деградации АТФ в ткани сосудов [9]. Можно предположить, что у мышей KO развитие портальной гипертензии могло быть сопряжено с изменением активности Panx1-независимых путей секреции АТФ из клеток (например, коннексиновых полуканалов или максианионных каналов [10]), однако в настоящей работе эти механизмы не исследовались. Таким образом, влияние Panx1 может сдерживать функциональное ремоделирование артерий брыжейки у мышей с портальной гипертензией, механизмы такого влияния являются предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-75-01111).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dahl G. ATP release through pannexon channels. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370(1672):20140191.
2. Velasquez S, Eugenin EA. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. Front Physiol. 2014;5:96.
3. Willebrords J, Maes M, Pereira IVA, da Silva TC, Govoni VM, Lopes VV, Crespo Yanguas S, Shestopalov VI, Nogueira MS, de Castro IA, Farhood A, Mannaerts I, van Grunsven L, Akakpo J, Lebofsky M, Jaeschke H, Cogliati B, Vinken M. Protective effect of genetic deletion of pannexin1 in experimental mouse models of acute and chronic liver disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018;1864(3):819-830.
4. Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. World J Gastroenterol. 2014;20(10):2555-63.
5. Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK, Chekeni FB, Ravichandran KS, Penuela S, Laird DW, Isakson BE. Pannexin1 regulates α1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction.Circ Res.2011;109(1):80-5.
6. Gaynullina D, Tarasova OS, Kiryukhina OO, Shestopalov VI, Panchin Y. Endothelial function is impaired in conduit arteries of pannexin1 knockout mice. Biol Direct. 2014;9:8.
7. Battulin N, Kovalzon VM, Korablev A, Serova I, Kiryukhina OO, Pechkova MG, Bogotskoy KA, Tarasova OS, Panchin Y. Pannexin 1 Transgenic Mice: Human Diseases and Sleep-Wake Function Revision. Int J Mol Sci. 2021;22(10):5269.

8. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res. 1977;41(1):19-26.
9. Banz Y, Beldi G, Wu Y, Atkinson B, Usheva A, Robson SC. CD39 is incorporated into plasma microparticles where it maintains functional properties and impacts endothelial activation. Br J Haematol. 2008;142(4):627-37.
10. Lazarowski ER, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Kreda SM. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. Adv Pharmacol. 2011;61:221-61.

ВОЗМОЖНОСТИ ШИРОКОПОЛЬНОЙ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ В РЕЖИМЕ РЕГИСТРАЦИИ СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЙ В КОРЕ ГЛОВОНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫХ ЛОКАЛЬНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ

Кислухина Е.Н.[1], Лизунова Н.В.[1], Дубас В.И.[2], Сурин А.М.[3], Бакаева З.В.[1,4]

[1]ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия
[2]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия
[3]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия
[4]ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия

Введение. Изучение патофизиологии повреждений коры мозга, в том числе, ишемического инсульта является одной из первостепенных задач современного здравоохранения. Инсульт занимает второе место в структуре общей смертности, а также является одной из ведущих причин инвалидизации населения [1]. Кроме того, около 70 миллионов человек ежегодно во всем мире получают черепно-мозговые травмы [2]. Несмотря на многочисленные исследования, до сих ограничены подходы для терапии повреждений мозга. Важной задачей является разработка адекватных доклинических моделей для изучения последствий и тестирования перспективных методов лечения. Целью данного исследования являлась оценка возможностей широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) в режиме регистрации светорассеяния для детектирования изменений активности коры мозга мышей, вызванных фотоиндуцированной ишемией.

Методы. В эксперименте использовали самцов мышей линии C57Bl/6 (2 месяца, 25–30 г), животных содержали в стандартных условиях (22ºC, световой день/ночь – 12/12 ч). Все процедуры соответствовали Директиве 2010/63/EU.

За месяц до эксперимента проводили истончение черепа как описано ранее [3]. Вкратце, после анестезии (Золетил/Ксилазин, 100/8 мг/кг) удаляли мягкие ткани с дорзальной поверхности головы, истончали кость, покрывали её полимером и фиксировали титановый холдер. После операции в течение 3 дней проводили противовоспалительную и антибактериальную терапию и минимум через неделю начинали адаптацию к установке ШОН.

Животные были разделены на три группы: без введения фотосенсебилизатора («Без БР»), бодрствующие («Бодрствование») и под анестезией (изофлуран 1.5% +100% O_2) («Изофлуран») в момент индукции ишемии. За 11 дней до фототромбоза (ФТ) проводили моторные тесты «Решётка», «Цилиндр», отбор проб крови и съёмку гемодинамической активности коры мозга методом ШОН.

Для регистрации гемодинамической активности коры методом ШОН мозг животного освещали поочередно светодиодами 505 нм и 656 нм (Mightex, США) с суммарной частотой 40 Гц и рассеянный свет регистрировали скоростной камерой (Mightex, США). Бодрствующим животным обеспечивали подвижность с помощью левитирующей платформы (Neurotar, Финляндия).

Фототромбоз индуцировали в области соматосенсорной коры правого полушария лазером (532 нм, 2000 мВт, 5 мин) через 5 минут после введения бенгальского розового (БР) (10 мг/кг). За 4 дня животным предварительно устанавливали катетер во внутреннюю яремную вену. Через 1.5, 24 и 72 ч после ФТ проводили съёмки гемодинамики коры мозга методом ШОН. Поведенческие тесты и забор крови повторяли через 24 и 72 часа после ФТ.

После завершения эксперимента проводили эвтаназию, извлекали мозг, окрашивали срезы ТТС для определения размера очага.

Для анализа данных ШОН использовали программу на языке программирования Python «Программа для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации» [4], а также дополнительные программные модули на языке Python. Оценивали функциональную связанность коры в покое по анализу матриц корреляции и гомотопической корреляции (корреляция активности симметричных относительно сагиттального шва пикселей) изменений концентрации суммарного гемоглобина ($\Delta C(HbT)$) в частотном диапазоне 0.08–0.4 Гц. Для оценки корреляции использовали коэффициент корреляции Пирсона, при усреднении коэффициентов применяли z-трансформацию Фишера.

Результаты и обсуждения. Одним из подходов в области ШОН является оптическое картирование по внутреннему сигналу (IOSI), основанное на регистрации изменений спектральных свойств тканей мозга. Метод позволяет косвенно оценивать нейрональную активность по относительным изменениям концентраций форм гемоглобина, отражающих локальные колебания кровотока, аналогично фМРТ и фБИКС. Интерпретация данных основана на механизме нейроваскулярного сопряжения – притока крови к области активации

нейронов [5]. Показано, что в частотном диапазоне 0.08–0.4 Гц гемодинамические сигналы достоверно отражают активность нейронов [6,7]. В норме гемодинамическая и нейрональная активность функционально или анатомически связанных зон в покое, без предъявления стимулов и в отсутствии определенных задач, характеризуется высокой степенью корреляции. Мы оценили, как повреждение мозга влияет на функциональную связанность коры больших полушарий головного мозга в покое у мышей.

При оценке диаметра размера очага через 72 часа после ФТ мы обнаружили, что даже в группе без введения фотосенсибилизатора на срезах мозга выделяется область некроза, соответствующая диаметру лазерного луча (среднее значение диаметра очага в группе без введения БР составило 1.51±0.3 мм). Это указывает на наличие повреждающего действия лазера на ткани мозга, присутствующее во всех исследуемых группах. При этом наличие небольшого локального повреждения мозга в группе без введения БР позволило выявить наиболее чувствительные параметры для оценки тяжести повреждения. Диаметр очага в группах животных, с индукцией ФТ при бодрствовании и под изофлурановым наркозом составил 3.07±0.97 и 3.67±0.79 мм соответственно, значения статистически значимо отличались от группы без введения БР ($p = 0.026$ и $p = 0.001$ соответственно).

Визуальная оценка матриц корреляции выявила различия в паттерне изменений функциональной связанности зон, вызванных повреждением (Рис.1). Наиболее выраженные изменения наблюдали в коэффициентах корреляции между полушариями (области по диагонали от нижнего левого угла к правому верхнему) в острейшем периоде (до 24 часов) в группе с индукцией ФТ под действием изофлурана.

Анализ дисперсии усредненных коэффициентов межполушарной связанности в модели со смешанным дизайном продемонстрировала наличие статистически значимого взаимодействия факторов «группа» и «время» относительно индукции ФТ ($p < 0.05$). При этом в группе «Изофлуран» наблюдали статистически значимое снижение межполушарной связанности через 1.5 и 24 часа после индукции инсульта при $n = 5$ ($p = 0.001$ и $p = 0.002$ при сравнениях с точкой времени до инсульта. Кроме того, значения межполушарной связанности значимо различались между группами ($p < 0.01$) на 1 сутки после ФТ (для группы «Без БР» $r = 0.19±0.04$, «Бодрствование» - $r = 0.10±0.04$, «Изофлуран» - $r = -0.01±0.02$).

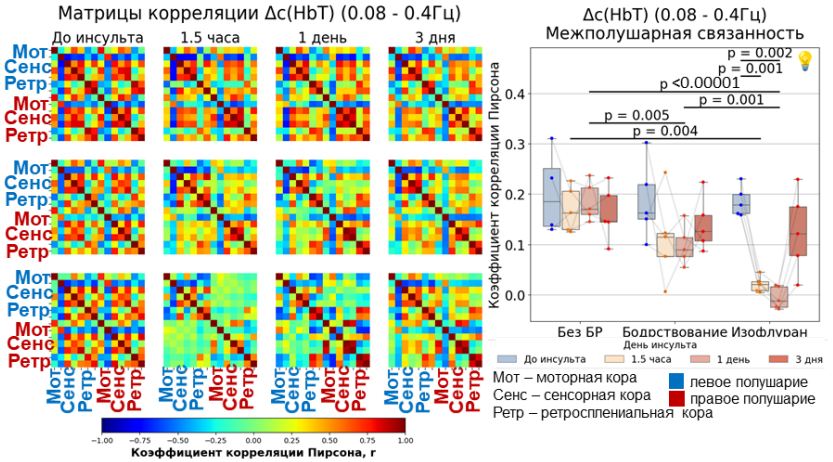


Рис. 1. Матрицы корреляции HbT-сигнала между анатомически связанными зонами коры у бодрствующих мышей в спокойном состоянии в разных группах на разное время после индукции ФТ. Представленные усредненные значения (n = 4-5 в группе) Справа – усредненные значения коэффициентов корреляции зон между полушариями. Mixed-ANOVA, с последующими rm-ANOVA с поправкой Бонферрони и one-way ANOVA с поправкой Тукей, n = 4-5. Лампочка обозначает наличие значимых взаимодействий различных факторов.

Построение карт гомотопической корреляции ΔC(HbT) подтвердило полученные при оценке матриц корреляции данные (Рис. 2). Наиболее выраженные изменения гомотопической корреляции наблюдали в группе «Изофлуран», при этом изменения во всех группах затрагивали не только соматосенсорную область очага инсульта, но и более удаленные зоны (моторную, ретросплениальную).

Через 24 часа после ФТ во всех группах отмечалось статистически значимое увеличение как общего количества ошибок в тесте «Решётка», так и ошибок контралатеральными стороне повреждения конечностями в тесте «Решётка». Различия между группами по этому показателю не достигли уровня значимости ($p<0.05$). В тесте «Цилиндр» наибольшая асимметрия в использовании передних конечностей наблюдалась у животных, перенёсших ишемию под наркозом, наряду с повышенной вариабельностью данных на 1-е и 3-и сутки после ФТ по сравнению с контролем. Таким образом, тест «Решётка» продемонстрировал наибольшую чувствительность к сенсомоторному дефициту, тогда как тест «Цилиндр» позволил выявить различия между экспериментальными группами. Наиболее выраженное снижение моторной функции в группе «Изофлуран» согласуется с результатами широкопольной нейровизуализации.

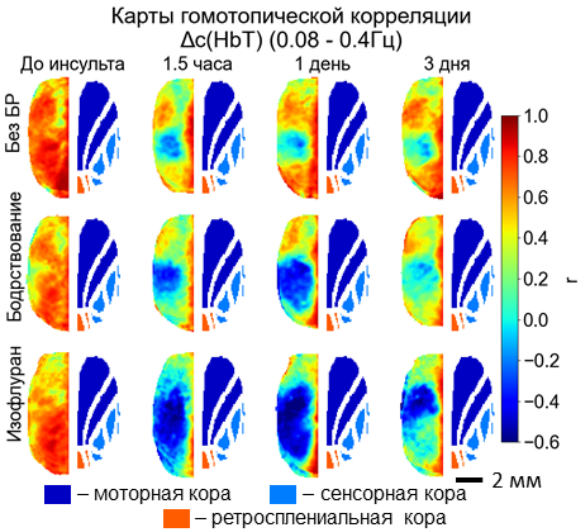


Рис. 2. Карты гомотопической корреляции HbT-сигнала у бодрствующих мышей в спокойном состоянии в разных группах в разное время после индукции ФТ. Усредненные значения для 5 мышей в группе.

Наличие статистически значимого взаимодействия фактора «группа» и «время» относительно индукции ФТ ($p < 0.05$) было обнаружено для концентрации маркера повреждения в сыворотке крови. Через 24 часа после повреждения значения концентраций NSE (neuron-specific enolase) в группах статистически значимо различались, при этом наибольшее значение было в группе «Изофлуран». Через 72 часа после инсульта в группе с наибольшим размером очага этот показатель продолжил рост, при этом мы обнаружили статистически значимую разницу между группой «Бодрствование» и «Изофлуран» в этой временной точке. Размер очага повреждения, определенный методом окраски срезов ТТС, положительно коррелировал со степенью увеличения маркера повреждения NSE в сыворотке крови на 3 сутки после повреждения ($r = 0.86$, $p < 0.0001$). Концентрация маркера NSE также статистически значимо высоко коррелировала с нарушением межполушарной связанности на 1 сутки ($r = 0.86$, $p < 0.0001$).

Выводы. Проведённое исследование демонстрирует эффективность метода широкопольной оптической нейровизуализации в режиме светорассеяния для оценки последствий корковых повреждений в условиях хронического эксперимента. В отличие от методов, основанных

на регистрации кальциевой активности, данный подход не требует сложных и затратных процедур по получению трансгенных животных с экспрессией кальциевого сенсора, что делает его более доступным. Мы показали, что усредненные коэффициенты межполушарной функциональной связанности, определенные по Δc(HbT) сигналу в диапазоне частот 0.08–0.4 Гц обладают высокой чувствительностью к степени тяжести повреждения и позволяет выявлять межгрупповые различия даже при ограниченной выборке. Наиболее выраженные повреждения, зафиксированные в группе «Изофлуран», могут быть связаны с использованием этого анестетика в смеси со 100% медицинским кислородом и особенностями индукции фототромбоза в данном эксперименте, что требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено в рамках Гос. задания № FGFU-2025-0004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Церебральный инсульт: современное состояние проблемы, Журнал Неврологии и Психиатрии Им. С.С. Корсакова 124 (2024) 7–18. https://doi.org/10.17116/jnevro20241241117.
2. M.D. Wiles, Management of traumatic brain injury: a narrative review of current evidence, Anaesthesia 77 (2022). https://doi.org/10.1111/anae.15608.
3. Е.Н. Кислухина, Н.В. Лизунова, О.Ю. Лисина, Р.Р. Шарипов, И.А. Красильникова, З.В. Бакаева, В.Г. Пинелис, А.М. Сурин, Индуцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca2+-сенсор GCaMP6f, Патологическая Физиология и Экспериментальная Терапия 67 (2023) 5–20.
4. Н.В. Лизунова, Е.Н. Кислухина, А.М. Сурин, Л.Р. Горбачева, З.В. Бакаева, Программа для автоматизации выделения физиологически значимых сигналов из данных широкопольной оптической нейровизуализации. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024666595, Российская Федерация. Бюл. № 7 ., (2024).
5. E.M.C. Hillman, Coupling Mechanism and Significance of the BOLD Signal: A Status Report, Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Neuro-071013-014111 37 (2014) 161–181. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-071013-014111.
6. P.W. Wright, L.M. Brier, A.Q. Bauer, G.A. Baxter, A.W. Kraft, M.D. Reisman, A.R. Bice, A.Z. Snyder, J.-M. Lee, J.P. Culver, Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice, PLoS One 12 (2017) e0185759. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185759.
7. L.M. Brier, E.C. Landsness, A.Z. Snyder, P.W. Wright, G.A. Baxter, A.Q. Bauer, J.-M. Lee, J.P. Culver, Separability of calcium slow waves and functional connectivity during wake, sleep, and anesthesia, Neurophotonics 6 (2019) 035002–035002. https://doi.org/10.1117/1.nph.6.3.035002.

ИЗМЕНЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И МИКРОРЕОЛОГИИ ДОНОРСКИХ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ

Козлова Е.Д.[1], Скверчинская Е.А.[2], Букатин А.С.[1], Филиппова О.И.[3], Колосков А.В.[3], Миндукшев И.В.[2]

[1]Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алферова, РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2]ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3]СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Одним из самых обсуждаемых вопросов трансфузионной медицины является безопасность переливания эритроцитов. Известно, что хранение вызывает нарушение их метаболизма, старение, потерю компонентов мембраны и высвобождение микровезикул, а также изменения реологических характеристик, включая фильтруемость и деформируемость [1,2]. Хранение эритроцитов влияет на их механические свойства и реологию крови, доставку кислорода и взаимодействие между текущей кровью и сосудистой системой [3-5]. Основным показателем качества эритроцитов служит гемолиз, уровень которого не должен превышать 0,8%. Срок гипотермического хранения лейкоредуцированных эритроцитов, заготовленных с раствором антикоагулянта CPD и ресуспендирующего раствора SAGM составляет 42 сут, хотя повреждение хранения становится заметным уже в начале 2-й недели [2]. Цель исследования – анализ деформируемости и микрореологии эритроцитов при хранении.

Материалы и методы. Образцы эритроцитарной взвеси, ЭВ, (n=4) тестировали еженедельно в течение 42 сут и дополнительно вне срока хранения на 60 сут. Гематологические показатели (концентрация эритроцитов, RBC, гемоглобина, Hb, средний объем эритроцитов, MCV, ширина распределения по объему, RDW) контролировали на анализаторе Medonic-M20. Деформируемость оценивали при проведении osmotic fragility test, OFT, методом лазерной дифракции на анализаторе Ласка-ТМ (Биомедсистемы, Россия) [6]. Гемолиз (freeHb, %) оценивали по уровню экстинкции водных гемолизатов и надосадочной жидкости при 540 нм на ридере CLARIOstar. Микрососудистую гемодинамику моделировали в микрофлюидном устройстве, МФУ, представляющем собой капиллярный миметик, микроканалы которого были изготовлены с использованием стандартной техники мягкой литографии [7]. Эксперименты были одобрены Этическим комитетом ИЭФБ РАН № 03-02 от 28.02.2024.

Результаты и обсуждение. В день заготовки ЭВ концентрация Hb составляла 191±11 и 208±26 г/л на 42 сут, p<0.665, RBC – 7.23±0.13 vs 6.95±0.34, p<0.869. На протяжении хранения уровень freeHb нарастал (рис. 1А), но не выходил за пределы 0.8% контроля качества, но уже на 60 сут хранения уровень freeHb составлял 1.42±0.14% (p<0.05 vs 42 сут). По данным литературы, 35 сут хранения ЭВ уже может быть рискованно именно из-за быстрого накопления freeHB [8]. Хранение вызывало разнонаправленное действие на объем эритроцитов, происходило и повышение уровня MCV, и образование микроцитов (рис. 1Б,В). Результатом было повышение уровня RDW (рис. 1Г), который на 28 сут был выше исходного уровня на 17% (p<0.042).

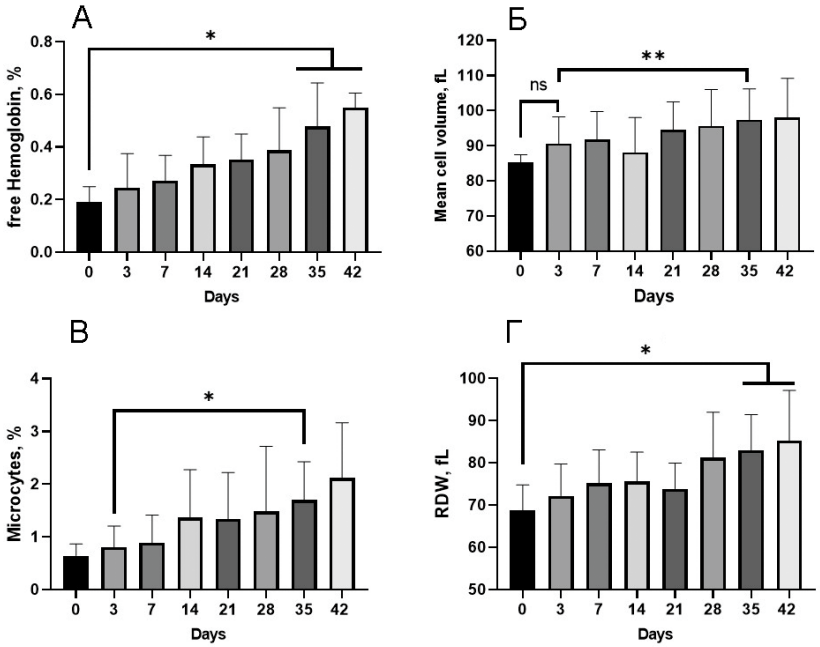


Рис. 1. Хранение эритроцитов вызывает усиление гемолиза (А), повышение объема (Б) с одновременным накоплением микроцитов (В), что совместно приводит к повышению гетерогенности популяции эритроцитов по объему, RDW (Г); mean + SD; one way ANOVA, *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Анизоцитоз (показатель RDW) признан независимым и сильным предиктором неблагоприятных клинических исходов при различных заболеваниях [9]. Переливание эритроцитов само по себе приводит к

повышению анизоцитоза, а значит, уровень RDW эритроцитов ЭВ должен регистрироваться для оценки прогностического уровня RDW реципиента [10].

Осмотическая хрупкость является комплексным параметром морфо-цитологических показателей эритроцитов и отражает их способность к деформируемости [11]. Значение H50 показывает при какой осмоляльности среды происходит лизис 50% эритроцитов.

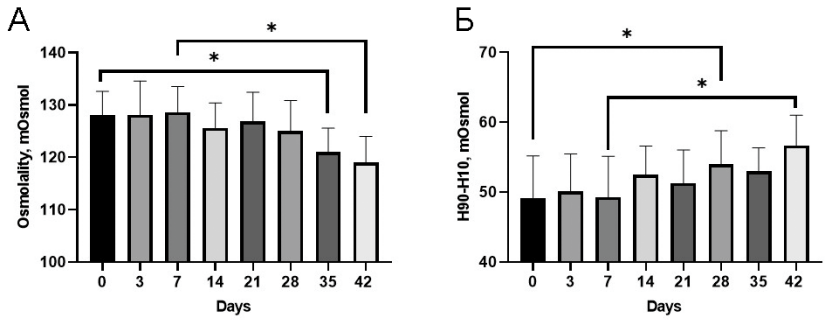


Рис. 2. Повреждение хранения приводит к изменению осмотической устойчивости эритроцитов: (А) – в конце срока хранения эритроциты становятся осмотически ригидными, (Б) а популяция более гетерогенной по устойчивости к гипоосмотической нагрузке, что оценивается по повышению дельты mOsm, между H10 и H90; метод лазерной дифракции, OFT; one way ANOVA; *, $p \leq 0.05$.

За 28 сут хранения не отмечено значимых нарушений осмотической устойчивости, H50 (рис.1А). На 35 сут хранения регистрировали усиление осмотической ригидности эритроцитов ($p<0.029$). Значение H50 складывается устойчивости пула клеток, который имеет исходно разные биофизические характеристики, и, соответственно, будет с разной степенью (скоростью) повреждаться при хранении. Для оценки осмотической гетерогенности эритроцитов использовали показатель W = H10-H90 (лизис 10% и 90%). Установлено, что хранение приводит к уширению границ устойчивости к гипоосмотической нагрузке (рис. 2Б), очевидно, за счет повышения доли более ригидных клеток. Полученные результаты указывают на высокую вероятность нарушения деформируемости.

Движение эритроцитов по микроканалам МФУ использовали как интегративный показатель сохранности деформируемости. Всего было проанализировано 4374 клеток заготовленной ЭВ, что позволило выявлять нарушения на уровне субпопуляций клеток. После месяца хранения средняя скорость транзита эритроцитов имела тенденцию к снижению

(рис. 3В). Анализ распределения по скоростям показал (рис. 3А,Б), что на 35-42 сут формируется так называемый «пул медленных клеток» (рис. 3Г,Б в рамке). Отмеченный на 35-42 сут хранения сдвиг моды скоростей вправо, предположительно обусловлен автоматической регистрации теней, при гидродинамическом разрушении жестких эритроцитов в МФУ.

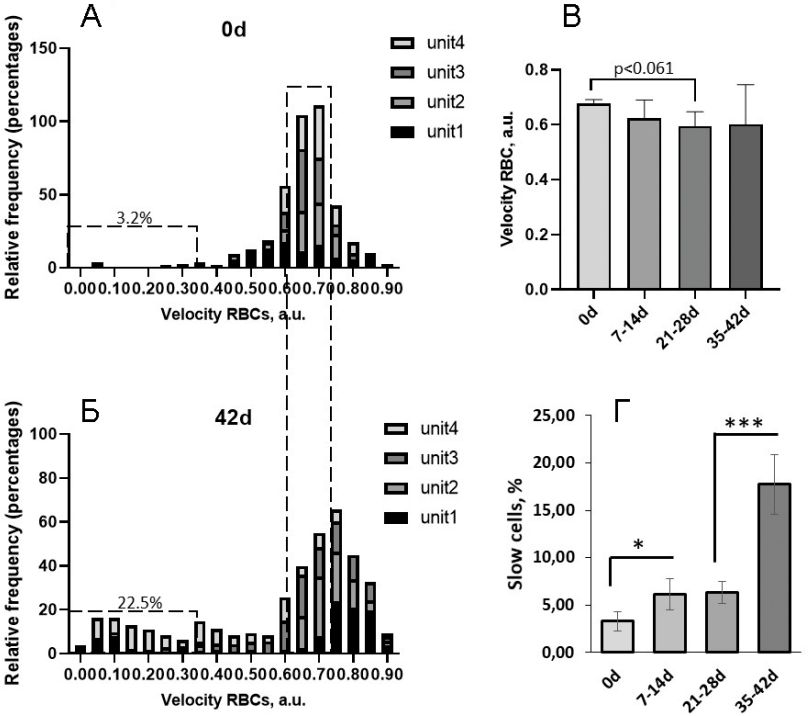


Рис. 3. Микрореология эритроцитов в микроканалах нарушается при длительном хранении: (А) – доля медленных клеток на 0 сут хранения небольшая, но резко повышается на 35-42 сут (Б, выделено в рамке); В – расчет средних значений скорости не выявил значимых различий; Г – доля медленных клеток в зависимости от срока хранения эритроцитов; one way ANOVA; *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$.

Это предположение требует дальнейшего изучения, поскольку гемолиз внутри МФУ служит маркером того, что такие эритроциты могут подвергаться усиленному разрушению в условиях циркуляции. Сублетальная травма эритроцитов, которая не выявляется тестом на

гемолиз, может проявляться при напряжении сдвига в микроканалах. В настоящее время не существует общепринятых тестов для оценки сублетальных (до гемолизных) повреждений эритроцитов. Мы регистрировали также усиление адгезии эритроцитов, что приводило к повышению % окклюзий в 3-5 раз (рис. 4А). Отмечено, что на поздних сроках хранения эритроциты могут образовывать кратковременные скопления перед входом в микроканал (рис. 4Б). Такие «заторы» могут снижать количество функционирующих капилляров, вызывая ишемию тканей [12].

Рис. 4. Фотографии микроканалов с эритроцитами (микроскоп Leica, 20х), микрофлюидный тест.

Известно, что на элиминацию эритроцитов из циркуляции влияют несколько факторов, в том числе жесткость мембран [13]. Мы показали, что при хранении 35-42 сут снижение деформируемости эритроцитов сопровождается нарушениями микрореологии эритроцитов в каналах МФУ. Мы также показали, что профилирование отдельных эритроцитов методом микрофлюидного анализа позволяет раскрывать биофизическую гетерогенность популяции эритроцитов (выделение субпопуляции эритроцитов с нарушениями транзита, медленные клетки). Эти результаты будут полезны для совершенствования методов контроля банковской крови и повышения безопасности трансфузий.

Исследование выполнено по ГЗ № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. D'Alessandro A, et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. Transfusion. 2015;55(1):205-219.
2. Barshtein G, I. Pajic-Lijakovic, and A. Gural, Deformability of Stored Red Blood Cells. Front Physiol. 2021;12:722896.
3. Сергунова ВА, и др. Конформационные нарушения мембран эритроцитов в процессе длительного хранения эритроцитной взвеси. Гематол трансфузиол. 2022;67(2): 181-192.

4. Barshtein G, et al., Deformability of transfused red blood cells is a potent determinant of transfusion-induced change in recipient's blood flow. Microcirculation. 2016;23(7):479-486.
5. Alshalani A, et al., The impact of biological age of red blood cell on in vitro endothelial activation markers. Front Physiol. 2023;14:1127103.
6. Герда БА, и др. Сравнительный анализ осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных. ЖЭБФ. 2024;60(5):460-482.
7. Besedina NA, et al., Persistent red blood cells retain their ability to move in microcapillaries under high levels of oxidative stress. Comm Biol. 2022;5(1):659.
8. Goel R, et al. Red blood cells stored 35 days or more are associated with adverse outcomes in high-risk patients. Transfusion. 2016;56(7):1690-1698.
9. Peng S, et al. Association between red blood cell distribution width and all-cause mortality in unselected critically ill patients: Analysis of the MIMIC-III database. Front Med (Lausanne). 2023;10:1152058.
10. Spadaro S, et al. The effects of blood transfusion on red blood cell distribution width in critically ill patients: a pilot study. Transfusion. 2018;58(8):1863-1869.
11. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. Blood. 1983;61(5):899-910.
12. Olia SE, et al. Mechanical blood trauma in assisted circulation: sublethal RBC damage preceding hemolysis. Int J Artif Organs. 2016;39(4):150-159.
13. Huisjes R. et al. Squeezing for life – properties of red blood cell deformability. *Front. Physiol*. 2018;9:656.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ И МАЛЫХ ДОЗ СОЛЕЙ АММОНИЯ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ КРЫС В МОДЕЛИ ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ПЛАВАНИЯ

Корф Е.А., Новожилов А.В., Миндукшев И.В., Гончаров Н.В.

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

Введение. Изучение механизмов воздействия природных препаратов, способствующих повышению выносливости и снижению утомляемости, представляет собой одно из ключевых направлений в спортивной физиологии и медицине. Нутрицевтики, к которым относятся пищевые добавки, компоненты пищи, минералы и природные метаболиты, могут улучшать физическую работоспособность и снижать утомляемость благодаря благоприятному влиянию на баланс сигнальных и метаболических процессов в клетках и тканях организма [1,2]. Эффект некоторых нутрицевтиков, включая экстракт зеленого чая (ЭЗЧ), обусловлен активацией жирового катаболизма, повышением чувствительности к инсулину и толерантности к глюкозе [3]. Данные эффекты могут способствовать повышению выносливости животных в экспериментальных моделях беговых и плавательных нагрузок [4,5]. Показана эффективность ЭЗЧ при синдроме хронической усталости [6] и мышечной дистрофии Дюшенна [7], установлены иммуномодулирующие свойства ЭЗЧ при интенсивных физических нагрузках [8-10].

Среди биохимических механизмов адаптации, находящихся в реципрокных отношениях с ионами Ca^{2+}, процессы генерации и потребления АТФ имеют решающее значение в условиях как аэробной, так и анаэробной нагрузки. Лактат и аммиак ранее считались побочными продуктами метаболизма, чей транспорт и нейтрализация исключительно в печени осуществлялись циклом Кори и аланина. Роль лактата, в отличие от роли аммиака, переоценена довольно давно, и теперь он рассматривается как важнейший межклеточный энергетический челнок и сигнальный агент [11]. В быстрых мышцах увеличивается экспрессия монокарбоксилатного переносчика 4-го типа (MCT4) для увеличения экспорта лактата, который поступает в эритроциты и медленные мышцы через MCT1 [12]. Эритроциты помогают транспортировать лактат от клеток-продуцентов к клеткам-потребителям, а роль эритроцитов у тренированных спортсменов возрастает [13].

Аммиак непрерывно образуется во всех органах и тканях организма. Наиболее активными его продуцентами являются органы с

высоким метаболизмом аминокислот и биогенных аминов, такие как нервная ткань, печень, кишечник и мышцы. Основными биохимическими источники аммиака – окислительное дезаминирование глутамата во всех тканях, кроме мышечной; неокислительное дезаминирование некоторых аминокислот в печени; дезамидирование глутамина и аспарагина; катаболизм биогенных аминов; жизнедеятельность бактерий кишечника; распад пуриновых и пиримидиновых оснований при участии аденилаткиназы и АМФ-дезаминазы. Аммиак представляет собой высокотоксичное соединение, что обусловливает необходимость его обезвреживания в тканях посредством образования глутамата, глутамина, аспарагина и карбамоилфосфата. В отличие от нетренированных лиц, у спортсменов повышение выносливости обусловлено преимущественно не увеличением VO2max и окислительного потенциала мышц, а адаптивными изменениями в системе поддержания гомеостаза ионов Ca^{2+}, K^+, Na^+, Cl^-, H^+ и лактата [14]. При этом роль аммиака в данных адаптационных процессах остается малоизученной, отношение к аммиаку как к исключительно токсичному агенту за последние десятилетия практически не изменилось. Применение компонентов цикла мочевины (аргинина и цитруллина) для детоксикации аммиака может улучшать выносливость у марафонцев [15]. В то же время, в исследованиях с участием добровольцев было показано, что прекондиционирование малыми дозами аммония способствует повышению выносливости при субмаксимальных нагрузках [16].

Цель исследования состояла в разработке экспериментальной модели принудительного плавания крыс и проведение комплексного сравнительного анализа эффективности экстракта декофеинизированного зеленого чая (ЭЗЧ) и малых доз солей аммония (хлорида и карбоната) на физическую работоспособность крыс.

Материалы и методы. В качестве экстракта зеленого чая использовался Sunphenon-90D® (Taiyo International, США), который содержит катехины с минимальным количеством кофеина: полифенолы > 90%, катехины > 80%, EGCG > 45%, кофеин < 1%. Все эксперименты проводили в соответствии с правилами проведения работ с экспериментальными животными, утвержденными этической комиссией Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Самцов крыс аутбредной линии Wistar содержали в стандартных условиях вивария. Крыс в возрасте 8–10 недель массой 210±10 г предварительно адаптировали к воде в течение 5 дней при температуре воды 32 °C, а на 6-й день проводили тестирование с нагрузкой 7% от массы тела: плавание в течение 3 мин с интервалом в 1 мин при температуре воды 28 °C до полного истощения. По результатам тестирования крыс делили на группы в зависимости от продолжительности плавания, так что группы

достоверно не различались по средней, минимальной и максимальной продолжительности плавания. По результатам тестирования сформировали 7 групп: 1-я — интактные животные (отрицательный контроль, n=17); 2-я — положительный контроль: плавание и пероральное введение NaCl (физиологического раствора) в дозе 10 мг/кг (n=12) за 5 мин до нагрузки; группа 3 — введение хлорида аммония (ACL) в дозе 20 мг/кг (n=19) за 5 мин до начала нагрузки; группа 4 — введение карбоната аммония (ACR), в дозе 10 мг/кг (n=20) за 5 мин до начала нагрузки; группа 5 (ЭЗЧ, n=9) — пероральное введение водного раствора ЭЗЧ в дозе 12 мг/кг в пересчете на катехины за 2 ч до нагрузки и через 2 ч после окончания нагрузки (суточная доза катехинов 24 мг/кг); группа 6 (ЭЗЧ+ACL, n=8) — плавание на фоне ЭЗЧ (доза и способ введения — как в группе 5) в сочетании с ACL (10 мг/кг за 5 мин до начала нагрузки); группа 7 (ЭЗЧ+ACR, n=8) — плавание на фоне ЭЗЧ (доза и способ введения — как в группе 5) в сочетании с ACR (10 мг/кг за 5 мин до начала нагрузки). Все препараты вводили, начиная со 2-й недели эксперимента. В течение пяти дней 2-й недели и шести дней 3-й недели эксперимента крыс подвергали нормированной нагрузке: общая продолжительность плавания составляла 50–60% от тестовых показателей. На шестой день 2-й недели эксперимента проводили промежуточное тестирование. В течение четырех дней 4-й недели эксперимента крыс ежедневно подвергали максимальной нагрузке. На 4-й день, через 5 мин после окончания нагрузки, из хвостовой вены брали кровь для оценки уровня лактата, который определяли фотометрически с помощью портативного биохимического анализатора Accutrend Plus (Roche Diagnostics GmbH). Через сутки после последней нагрузки животных умерщвляли путем декапитации, кровь собирали в гепаринизированные пробирки (конечная концентрация гепарина 50 ед./мл) и отбирали аликвоты для гематологического и иммунологического анализа. После центрифугирования крови при 1500×g в течение 4 мин собирали плазму для биохимического анализа, а эритроциты дважды промывали охлажденным физиологическим раствором. Аликвоты плазмы и эритроцитов хранили при температуре -80 °C до анализа. Мышцы SOL и EDL извлекали для ультраструктурного и морфометрического исследования, выделения и очистки РНК.

Результаты. Динамика изменения всех групп показателей во всех группах животных относительно отрицательного и положительного контролей приведена в таблице 1. Относительно группы отрицательного контроля во всех группах животных однонаправленные статистически значимые изменения были выявлены только по одному показателю — уровню лактата через 5 мин после финальной нагрузки. В пяти группах из шести отмечено уменьшение средней площади поперечного среза Т-трубочек в

медленных мышечных волокнах SOL. Исключение составила группа ЭЗЧ+ACL, среди животных которой средняя площадь продольного среза Т-трубочек была максимально увеличена. В четырех группах из шести выявлено увеличение экспрессии гена *Serca2* как в медленных, так и в быстрых мышечных волокнах, но с некоторыми различиями между группами: в мышцах SOL экспрессия *Serca2* повышена в группах ACL, ACR, ЭЗЧ+ACL, ЭЗЧ+ACR; в мышцах EDL экспрессия *Serca2* повышена в группах NaCl, ACL, ЭЗЧ+ACL и ЭЗЧ+ACR. Для группы ЭЗЧ не наблюдалось никаких изменений экспрессии этого гена, тогда как для групп ACL, ЭЗЧ+ACL, ЭЗЧ+ACR отмечено увеличение экспрессии *Serca2* в обоих типах мышечных волокон. У крыс группы ACR отметим связь между отсутствием изменений экспрессии *Serca2* в мышцах EDL и значительным увеличением экспрессии *Myh2xd*, *CASQ1* и *PGC1α*, а также увеличением средней площади поперечного среза Т-трубочек только у крыс этой группы. Максимальное количество изменений (22) по всем группам показателей зафиксировано в группе ЭЗЧ+ACR, животные которой показали максимальный функциональный результат и минимальные значения лактата через 5 мин и 1 ч после окончания предельной нагрузки в последний день эксперимента. Далее по количеству изменений идут группы ACR (20), ACL (18), ЭЗЧ+ACL (17), ЭЗЧ (10) и NaCl (8). В целом количество выявленных адаптивных изменений пропорционально функциональному состоянию животных соответствующих групп, с точки зрения продолжительности плавательной нагрузки в последние 4 дня эксперимента. Однако важен не только количественный, но и качественный состав выявленных изменений. Максимальный количественный вклад в общий спектр изменений в группе ЭЗЧ+ACR (с максимальным количеством адаптивных изменений) вносят биохимические показатели, свидетельствующие об усилении аэробной утилизации липидов, оксидативного стресса и воспалительных процессов (снижение креатинина и трансферрина), снижении уровня анаболических процессов (понижение креатинина, ЛПВП, холестерина).

Заключение. Проведенное нами исследование демонстрирует, что как ЭЗЧ, так и соли аммония (ACL и ACR) оказывают значительное влияние на физическую выносливость, однако их эффекты зависят от типа соединения, дозировки и комбинации с другими веществами. Выявленные адаптивные изменения биохимических показателей эритроцитов крыс свидетельствуют о триггерной и (или) усиливающей функции экзогенных ионов аммония, которые имитируют терминальную стадию метаболического ацидоза скелетных мышц и активируют гликолитический путь окисления глюкозы в эритроцитах без участия шунта Рапопорта-Люберинг. Прекондиционирование солями аммония способствует подготовке эритроцитов для работы в условиях

Табл. 1. Изменения показателей крыс разных групп относительно показателей группы отрицательного контроля через 5 мин (лактат) и 24 часа после окончания последней нагрузки и цикла принудительного плавания.

	NaCl (n = 12)	**ЭЗЧ (n = 9)**	**ACL (n = 19)**	**ACR (n = 20)**	**ЭЗЧ+ACL (n = 8)**	**ЭЗЧ+ACR (n = 8)**
Концентрация лактата через 5 минут после нагрузки	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Биохимические показатели плазмы крови	Crea ↓			Urea ↓ UA ↓ Lactate ↓	Crea ↓	Transf ↓ Trigs ↓ Crea ↓ HDL ↓ Chol ↓
Биохимия эритроцитов	Piruvate ↓		MDA ↓	GR ↓ Lactate ↓ TMET ↓↓	GAPD ↓ GR ↓ BPG ↑ Lactate ↓	GR ↓ TMET ↓↓
Гематологические показатели		Lymph ↑	PLT ↓ PDW ↓ PCT% ↓	PCT% ↓		RDW ↓ PLT ↓
Иммунологические показатели	NKT-cells% ↓↓	T-cells ↑ Th ↑↑ Th 62L- ↑↑ CD4-CD8- ↑ Tcyt 62L+ ↑ Tcyt 44dim62L+ ↑	B-cells ↑↑ NKT-cells% ↓↓ Tcyt 62L+ ↑ Tcyt 44dim62L+ ↑ Th 62L- ↑↑ Th 44+62L- ↑↑	Th 44+62L-% ↑↑	Th 62L-% ↑ Th 62L+% ↓ Th 44+62L-% ↑↑ Th 44dim62L+% ↓	Th 62L-% ↑↑ Th 62L+% ↓ Th 44+62L-% ↑↑
Гены мышцы EDL	*Myhc1* ↑↑ *Serca2* ↑↑	*Myh2xd* ↑↑	*Serca2* ↑↑	*Myh2xd* ↑↑ *CASQ1* ↑↑	*Serca2* ↑↑	Myhc1 ↑↑ Serca2 ↑↑

				PGC1α ↑↑		
Гены мышцы SOL			*Myhc1* ↑↑ *Serca2* ↑↑	*CASQ1* ↑↑ *Serca2* ↑↑	*Myhc2a* ↓↓ *CASQ1* ↑↑ *Serca2* ↑↑	*Myh2xd* ↑↑ *Serca2* ↑↑ *PGC1α* ↓↓
Морфометрия мышцы EDL	Средняя площадь митохондрий ↑↑		Средняя площадь митохондрий ↑↑ Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑	Средняя площадь митохондрий ↑↑ Average cross-sectional area of T-tubules ↑↑ Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑↑	Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑↑	Средняя площадь митохондрий ↑↑ Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑↑
Морфометрия мышцы SOL	Средняя площадь поперечного среза Т-трубочек ↓	Средняя площадь поперечного среза Т-трубочек ↓↓	Средняя площадь митохондрий ↑ Средняя площадь поперечного среза Т-трубочек ↓	Средняя площадь митохондрий ↑ Средняя площадь поперечного среза Т-трубочек ↓ Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑	Средняя площадь митохондрий ↑↑ Средняя площадь продольного среза Т-трубочек ↑↑	Средняя площадь митохондрий ↑↑ Средняя площадь поперечного среза Т-трубочек ↓

↑ значение статистически значимо увеличено, но относительно слабо (до 50%); ↑↑ значение статистически значимо сильно увеличено (более 50%); ↓ значение статистически значимо снижено, но относительно слабо (до 50%); ↓↓ значение статистически значимо сильно снижено (более 50%).

максимальной нагрузки не в скелетных мышцах, как во время нагрузки, а преимущественно в сосудах брюшины и воротной вене. Эффект Бора реализуется за счет повышенной лактатной (и углекислотной) емкости эритроцитов. Прямое влияние ионов аммония на активность карбоангидразы эритроцитов и сродство гемоглобина к кислороду, не зависящее от влияния pH_i, требует специальных исследований.

Молекулярные механизмы стимулирующего работоспособность действия малых доз солей аммония заслуживают пристального внимания и требуют дальнейших исследований, как и схемы их совместного применения с полифенолами зеленого чая и другими нутрицевтиками.

Финансирование. Работа выполнена в рамках ГЗ 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goncharov, N.; Maevsky, E.; Voitenko, N.; Novozhilov, A.; Kubasov, I.; Jenkins, R.; Avdonin, P. Nutraceuticals in sports activities and fatigue. In Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity, 2nd ed; Gupta, R.C., Lall, R., Srivastava, A., Eds.; Academic Press/Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 177–188
2. Vahabzadeh Z., Molodi M., Nikkho B., Saghebjoo M., Saedmocheshi S., Zamani F., Roshani Y., Babanzadeh S. Aerobic training and hydroalcoholic extracts of green tea improve pro-oxidant-antioxidant balance and histopathological score in the N-methyl-N-nitrosourea-induced prostate cancer model of rat. EXCLI J. 2020;19:762.
3. Venables, M.C.; Hulston, C.J.; Cox, H.R.; Jeukendrup, A.E. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. Am. J. Clin. Nutr. 2008, 87, 78–84.
4. Murase, T.; Haramizu, S.; Shimotoyodome, A.; Tokimitsu, I.; Hase, T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2006, 290, R1550–R1556.
5. Nieri V, de Souza JF, Segato TCM, Caetano ÉLA, Leite FG, Chaud MV, Grotto D. Effects of Green Tea and Green Tea Incorporated in Nanoparticle Lyotropic Liquid Crystal on Exercise Adaptations: A High-Intensity Interval Training Pre-Clinical Study. Nutrients. 2022;14(15):3226.
6. Sachdeva, A.K.; Kuhad, A.; Tiwari, V.; Arora, V.; Chopra, K. Protective effect of epigallocatechin gallate in murine water-immersion stress model of chronic fatigue syndrome. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2010, 106, 490–496.
7. Dorchies, O.M.; Wagner, S.; Buetler, T.M.; Ruegg, U.T. Protection of dystrophic muscle cells with polyphenols from green tea correlates with improved glutathione balance and increased expression of 67LR, a receptor for (−)-epigallocatechin gallate. Biofactors 2009, 35, 279–294.
8. Lin, S.P.; Li, C.Y.; Suzuki, K.; Chang, C.K.; Chou, K.M.; Fang, S.H. Green tea consumption after intense taekwondo training enhances salivary defense factors and antibacterial capacity. PLoS ONE 2014, 9, e87580.

9. Ruiz-Iglesias P, Gorgori-González A, Massot-Cladera M, Castell M, Pérez-Cano FJ. Does Flavonoid Consumption Improve Exercise Performance? Is It Related to Changes in the Immune System and Inflammatory Biomarkers? A Systematic Review of Clinical Studies since 2005. Nutrients. 2021;13(4):1132.
10. Kruk J, Aboul-Enein BH, Duchnik E, Marchlewicz M. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. J Physiol Sci. 2022;72(1):19.
11. Ferguson, B.S.; Rogatzki, M.J.; Goodwin, M.L.; Kane, D.A.; Rightmire, Z. Lactate metabolism: Historical context, prior misinterpretations, and current understanding. Eur. J. Appl. Physiol. 2018, 118, 69–728.
12. Maciejewski, H.; Bourdin, M.; Feasson, L.; Dubouchaud, H.; Denis, C.; Freund, H.; Messonnier, L.A. Muscle MCT4 content is correlated with the lactate removal ability during recovery following all-out supramaximal exercise in highly-trained rowers. Front. Physiol. 2016, 7, 223.
13. Opitz, D.; Lenzen, E.; Opiolka, A.; Redmann, M.; Hellmich, M.; Bloch, W.; Brixius, K.; Brinkmann, C. Endurance training alters basal erythrocyte MCT-1 contents and affects the lactate distribution between plasma and red blood cells in T2DM men following maximal exercise. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2015, 93, 413–419.
14. Hostrup, M.; Bangsbo, J. Limitations in intense exercise performance of athletes—Effect of speed endurance training on ion handling and fatigue development. J. Physiol. 2017, 595, 2897–2913.
15. Cheng, I.S.; Wang, Y.W.; Chen, I.F.; Hsu, G.S.; Hsueh, C.F.; Chang, C.K. The supplementation of branched-chain amino acids, arginine, and citrulline improves endurance exercise performance in two consecutive days. J. Sports Sci. Med. 2016, 15, 509–515.
16. Mindukshev, I.; Sudnitsyna, J.; Goncharov, N.V.; Skverchinskaya, E.; Dobrylko, I.; Nikitina, E.; Krivchenko, A.I.; Gambaryan, S. Low-Dose Ammonium Preconditioning Enhances Endurance in Submaximal Physical Exercises. Sports 2021, 9, 29.

ДИНАМИКА РЕПАРАЦИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

Лисина О.Ю.[1], Красильникова И.А.[2], Шарипов Р.Р.[1], Московцев А.А.[1], Бакаева З.В.[2,3,4], Сурин А.М.[1]

[1]ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия
[2]ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия
[3]ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)», Москва, Россия
[4]ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия

Введение. Согласно анализу, выполненному Соминовым А.Б. и коллегами в ряде областей нашей страны [1], в России в 2000-2018 гг., средняя заболеваемость в результате травмы составляла 9%, причем черепно-мозговая травма (ЧМТ) занимала лидирующие позиции. Наиболее часто пострадавшими являются мужчины в возрасте 21-45 лет, т.е. наиболее работоспособная часть населения. Летальность при ЧМТ в России достигает 4%, а послеоперационная летальность – 19%, что обусловлено тяжестью состояния пострадавших, которым проводили операцию.

Для совершенствования терапии ЧМТ используют различные *in vivo* и *in vitro* модели травмы мозга. Механическое повреждение первичной нейрональной культуры было использовано в качестве модели механической травмы мозга уже достаточно давно [2,3]. Развитие техники регистрации изображений, программного обеспечения для обработки большого объема данных и новых средств молекулярно-биологического и цитохимического анализа (ингибиторов каналов, антител, флуоресцентных зондов и др.) позволили получить новую информацию о динамике кальциевых сигналов и митохондриальной деполяризации в острой фазе повреждения культуры [4-8] и в ходе многодневной репарации нейрональной сети [7-9]. Было показано, что в момент нанесения механического повреждения (царапины) происходит скачок внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), амплитуда которого максимальна в нейронах на границе царапины и убывает по мере удаления от границы царапины в неповреждённую область [4,5]. Рост $[Ca^{2+}]_i$ всегда сопровождался митохондриальной деполяризацией. В ~90% нейронов изменения $[Ca^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала блокировались ингибитором ионотропных глутаматных каналов NMDA-типа.

В данной работе исследовали изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в первичной культуре нейронов из коры головного мозга, начиная с первых минут нанесения механического повреждения, а затем отслеживали регенерацию нейрональной сети в зоне механического повреждения, в первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крысы. Было проверено на какое расстояние от границы повреждения распространяются изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в нейрональной сети. На примере нейронов из мозжечка 7-дневных крыс было проверено влияние перманентной частичной активации или частичного ингибирования глутаматных рецепторов NMDA-типа на восстановление нейрональной сети в зоне повреждения.

Материалы и методы. Первичные нейрональные культуры приготавливали из коры головного мозга или из мозжечка соответственно 1 и 7-дневных крыс породы Вистар, как описано в [4,5,9]. Суспензию клеток наносили на покровные стекла, прикрепленные к лункам в центре 35 мм пластиковых чашек Петри с плотностью $2{,}5 \cdot 10^5$ клеток/лунку («SPL Life Sciences», Корея или «Wuxi Nest Biotechnology Co., Ltd», Китай).

Для исследования изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ сразу после нанесения травмы использовали клеточные культуры в возрасте 12–15 дней после посадки. Клетки нагружали Fura-2 и потенциал-чувствительным флуоресцентным зондом Rh123. Флуоресцентно-микроскопические измерения проводили в солевых буферных растворах, как описано в [4,5].

В экспериментах, в которых репарацию зоны механического повреждения нейронов из мозжечка 7-дневных крыс регистрировали в течение нескольких дней, царапину (1х10мм) проводили с помощью пластикового наконечника для 10 мкл пипетки, спустя 72 часа после посадки. Мониторинг динамики репарации осуществляли с использованием системы на базе микроскопа Nikon Ti2 (Japan) с программным обеспечением NIS Elements. Фазово-контрастные изображения регистрировали камерой sCMOS Prime BSI Express (Teledyne Photomterics, USA). Клетки находились на предметном столике микроскопа в мини-CO_2-инкубаторе STX (Tokai Hit, Япония).

Подсчет средней суммы площадей тел (сомы) отдельных клеток, нейритов (дендритов и аксонов), конусов роста, сгустков клеток («плотной» нейрональной сети) и фрагментов разрушившихся клеток (дебриса) в зоне царапины основан на комплексном использовании программ Ilastik (алгоритм Pixel Classification) и FIJI (версия ImageJ).

Нейробазальная среда и B-27 Supplement приобретены у Gibco (USA); флуоресцентные индикаторы приобретены у ThermoFisher (USA), остальные реагенты – у Sigma (USA).

Уход за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Этического комитета ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии».

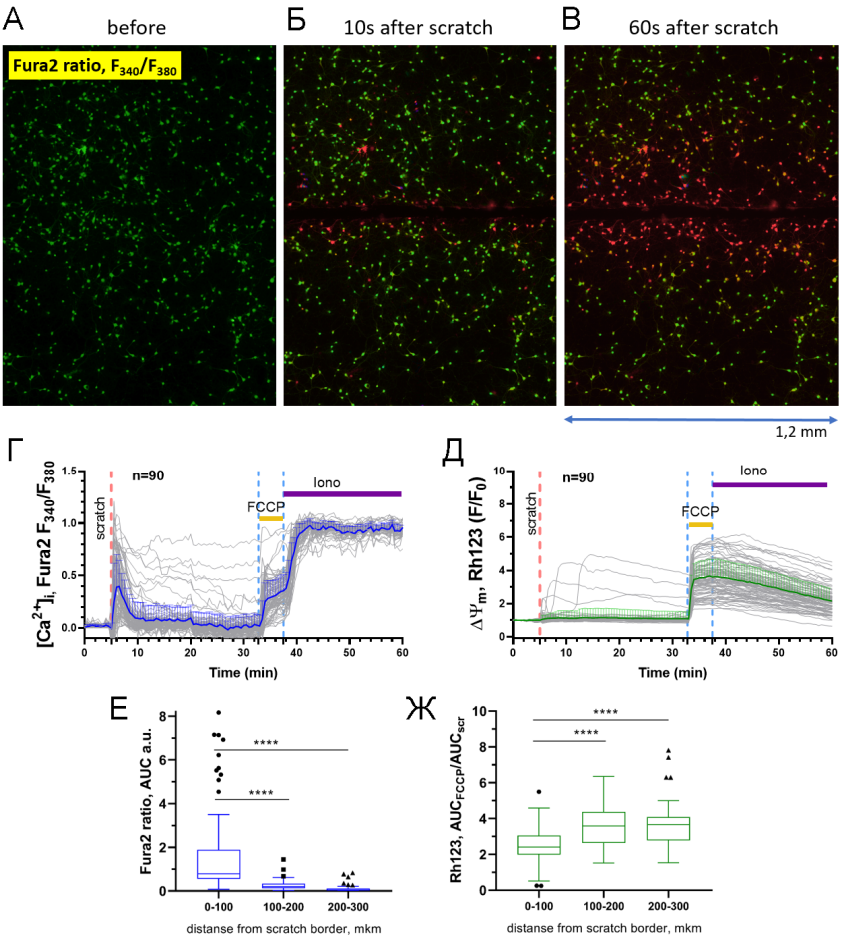


Рис. 1. Изменения $[Ca^{2+}]i$ и $\Delta\Psi_m$ в культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутых механической травме (scratch). Флуоресцентные изображения культуры нейронов, нагруженных Fura2 (F340/F380); изображения получены (А) до нанесения царапины, (Б) спустя 10 сек после повреждения культуры, (В) через 60 сек после царапины. Динамика изменений (Г) $[Ca^{2+}]_i$ (Fura-2, F340/F380) и (Д) $\Delta\Psi_m$ (Rh123), в культуре кортикальных нейронов, подвергнутых механическому повреждению для клеток, отстоящих не более 100 мкм от границы царапины до центра тела клетки. Масштабный отрезок соответствует 1.2 мм. Число клеток в каждой группе обозначено n. Кривые серого цвета соответствуют сигналам индивидуальных нейронов; синим и зеленым цветом представлены усреднённые

кривые со стандартными отклонениями. Площади под кривыми (AUC) флуоресценции зонда Fura-2 (Е) и Rh123 (Ж), вычисленные в период 5 мин после нанесения царапины для нейронов, находящихся на удалении 0-100 мкм, 100-200 мкм, 200-300 мкм от границы царапины до центра клетки, в каждой группе ~90 нейронов. Данные представлены как медианы и интерквартильный размах (one way ANOVA). Повреждение нейрональной сети производили со скоростью 2 мм/с иглой, установленной в механическом манипуляторе [4,5].

Статистический анализ данных, построение графиков, вычисление площадей под кривыми выполняли, используя программы GraphPad Prism 8 и Microsoft Excel 2010. Результаты статистической обработки представлены как среднее ± SEM (стандартная ошибка среднего). Статистически отличия считали достоверными, если $p < 0.05$ (two-tailed *t*-test).

Результаты и обсуждение.

Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в острой фазе нанесения повреждения. Измерения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, были выполнены в режиме «сшивания» изображений, благодаря чему можно было отследить изменения указанных параметров на расстоянии от границы царапины примерно 1 мм (рис. 1). Видно, что наиболее быстрые изменения $[Ca^{2+}]_i$ сосредоточены вблизи границ повреждения (рис. 1Е), хотя в отдельных нейронах скачок $[Ca^{2+}]_i$ отмечен на расстоянии около 500 мкм от границы царапины (рис. 1В). По-видимому, эти удаленные клетки, были соединены синаптическими контактами с теми нейронами, на которые механическая травма воздействовала непосредственно.

Доля клеток, отреагировавших на царапину ростом $[Ca^{2+}]_i$ значительно возросла в течение последовавших после травмы 5 мин (рис. 1В,Е). Вероятно, это те нейроны, чьё возбуждение обусловлено глутаматом (Glu), выделившимся из поврежденных нейронов в момент нанесения царапины [4,5]. Glu, диффундируя по объему буфера, постепенно разбавляется и рост $[Ca^{2+}]_i$ прекращается. Исключением были несколько нейронов, для которых концентрация выделившегося Glu оказалась нейротоксичной и в них развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция и сильная митохондриальная деполяризация (рис. 1Е,Ж) [10]. Также возможно, что в культуре были клетки, в которых имелись высокопроводящие пути поступления Ca^{2+} в цитоплазму помимо NMDA-каналов [6].

Рост сигнала Rh123, отражающий падение $\Delta\Psi_m$, был выше у клеток, расположенных на большем расстоянии от границы механического повреждения (рис. 1Ж), то есть наблюдалось явление, противоположное убыванию Ca^{2+} сигнала по мере удаления от границы царапины (рис. 1В,Е). Природа этого феномена не вполне ясна.

Динамика репарации области механического повреждения. Первичные нейрональные культуры из коры головного мозга крысы содержат значительное число глиальных клеток, которые могут диффундировать в зону механического повреждения и осложняют интерпретацию изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ [7,8]. Поэтому в данной работе для длительных экспериментов по «зарастанию» царапины мы использовали первичную культуру из мозжечка крысы, которая имеет гораздо меньшую долю глиальных клеток и состоит на 90-95% из нейронов [10].

На рис. 2 представлен фрагмент фазово-контрастного изображения культуры из мозжечка крысы, на котором показаны поврежденный участок и прилегающий к нему не поврежденный. Панели А и В демонстрируют изображения при разной интенсивности освещения и контрастности для более четкой визуализации тел клеток (рис. 2А) и нейритов (рис. 2Б). Этот же фрагмент изображения культуры после дифференциальной оценки с помощью программы Ilastik различных частей клеток (сомы, нейритов, конусов роста), скоплений клеток, а также не идентифицированных частиц (предположительно, фрагментов разрушившихся клеток, debris) представлен в псевдоцветном изображении. Динамика репарации механического повреждения представлена как процесс заполнения царапины «категориями», согласно анализу изображений в программе Ilastik. Разбивка по категориям показана на рис. 2В.

Из 8 «категорий», выбранных в программе Ilastik, в расчет динамики репарации повреждения были включены: тела клеток + нейриты + конусы роста + сгустки клеток (рис. 2Г). Из графиков видно, что частичное ингибирование NMDA-рецепторов с помощью МК-801, увеличивает процентную долю указанных «категорий» нейрональной сети в общей площади царапины. Положительный эффект ингибирования глутаматных рецепторов на динамику репарации согласуется с тем, что царапина повышает внеклеточную концентрацию глутамата, основного возбуждающего нейромедиатора ЦНС. Более того, в ряде клеток, примыкающих к границе царапины, происходит развитие отсроченной кальциевой дисрегуляции (рис. 1Г,Д), которая завершается гибелью нейронов [10].

Иммунофлуоресцентное окрашивание механически поврежденных первичных культур из коры головного мозга крысы показало, что в зоне царапины могут диффундировать как нейроны, так и астроциты [7,8]. В нейрональных культурах из мозжечка в зону царапины диффундируют клетки, которые морфологически соответствуют нейронам и очень редко клетки, морфологически напоминающие астроциты. Мы проверили, способны ли эти клетки функционально отвечать на стимуляцию глутаматных рецепторов NMDA-типа. Для этого культуру нагружали

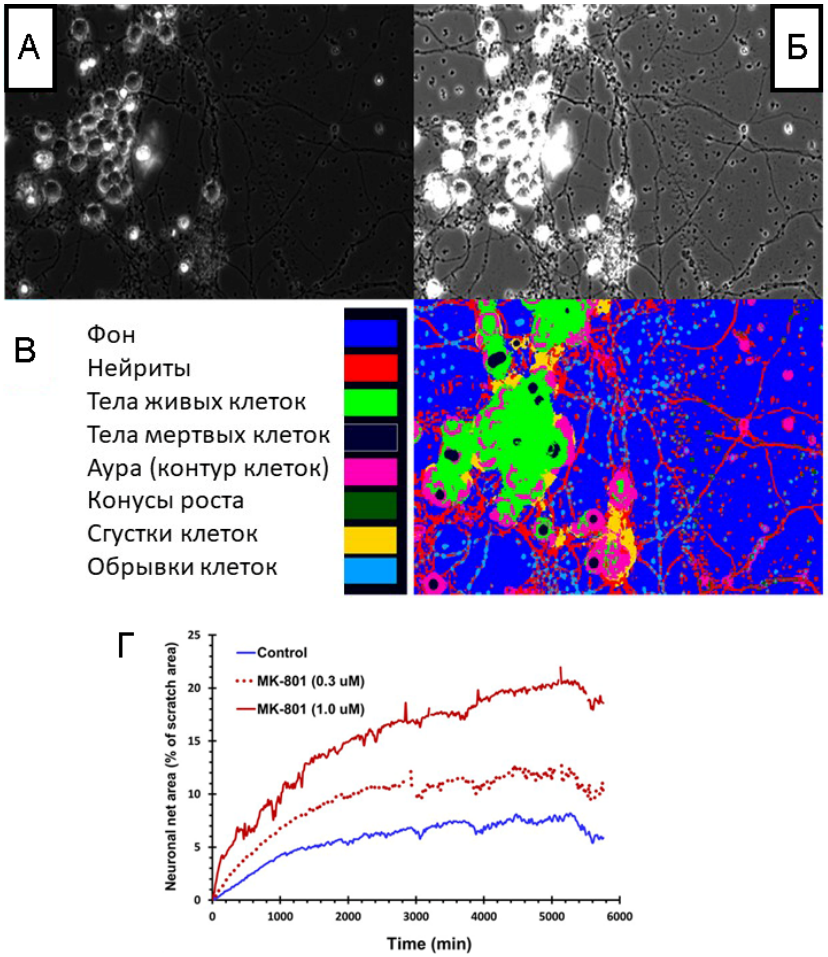


Рис. 2. Дифференцировка фазово-контрастных изображений по категориям на основе анализа изображений в программе Ilastik и динамика развития культуры после нанесения механического повреждения. (А, Б) Пример фазово-контрастного изображения первичной культуры нейронов мозжечка (в градациях серого цвета) с разными интенсивностями освещения (соотношение примерно 1:2) и контрастности; (В) Псевдоцветное представление фазово-контрастных изображений по категориям, дифференцированным в программе анализа изображений Ilastik; (Г) Влияние ингибирования NMDA-рецепторов на развитие культуры после нанесения механического повреждения; каждый график включает категории в пределах царапины: тела клеток + нейриты + конусы роста + сгустки клеток.

низкоаффинным Ca^{2+}-индикатором Fluo-4FF, который слабо реагирует на относительно небольшие изменения $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах, но является адекватным индикатором для регистрации высоких подъемов $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах (графики не приведены). Оказалось, что клетки повышают $[Ca^{2+}]_i$ при добавлении NMDA (500 мкМ), указывая на их нейрональную природу. Однако Ca^{2+}-ответы клеток в зоне царапины на стимуляцию NMDA-рецепторов были заметно ниже ответов в неповрежденной области. По-видимому, диффузия нейронов в зону механического повреждения задерживает экспрессию в них NMDA-рецепторов, либо на диффузию в зону повреждения преимущественно способны нейроны с относительно низкой экспрессией указанных ионотропных рецепторов. Кроме того, эти нейроны, очевидно, не должны иметь прочных контактов с другими клетками в неповрежденной зоне.

В заключение отметим, что новые методические возможности, в частности, регистрация быстрых Ca^{2+}- и $\Delta\Psi_m$-ответов на относительно больших площадях клеточной культуры, а также многодневная регистрация динамики заполнения поврежденной зоны нейритами и клетками, позволяют обнаружить неожиданные особенности репарации на клеточной модели ЧМТ. Кроме того, использование клеточной модели облегчает понимание молекулярно-клеточных основ репарации и способствует поиску перспективных агентов для ее регуляции [8].

Исследование выполнено согласно Гос. заданию № FGFU-2025-0004 и № FGFU-2025-0008, и при поддержке гранта РНФ 24-25-00426.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соминов АБ, Лебедев ИА, Древаль ОН, Гаибов СС-Х, Захарчук ЕВ, Некрасов НА. Распространённость и структура черепно-мозговой травмы в ряде субъектов Российской Федерации. Уральский медицинский журнал. 2020;10(193):156–159.
2. Mukhin AG, Ivanova SA, Knoblach SM, Faden AI. New in vitro model of traumatic neuronal injury: evaluation of secondary injury and glutamate receptor mediated neurotoxicity. J. Neurotrauma. 1997;14:651–663.
3. Mukhin AG, Ivanova SA, Allen JW, Faden AI. Mechanical injury to neuronal/glial cultures in microplates: role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. J. Neurosci Res. 1998;51(6):748–758.
4. Красильникова ИА, Бакаева ЗВ, Пинелис ВГ, Лисина ОЮ, Сурин АМ. Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме. Патогенез. 2018;16(3):124–128.
5. Красильникова ИА, Помыткин ИА, Пинелис ВГ, Сурин АМ. Инсулин способствует нормализации ионного гомеостаза и состояния митохондрий после механической травмы культуры нейронов мозга. Биологические мембраны. 2021;38(6):1–7.

6. Сурин АМ, Красильникова ИА, Лисина ОЮ, Бакаева ЗВ, Балясин МВ, Шарипов РР, Пинелис ВГ. Изменения внутриклеточного сигналинга и морфологии нейрональной сети в первичной культуре клеток коры головного мозга крысы при механической травме. Международная конференция рецепторы и внутриклеточная сигнализация. 20-24 мая 2019 г. Сборник статей (Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова). Стр. 288–293
7. Bakaeva Z, Goncharov M, Krasilnikova I, Zgodova A, Frolov D, Grebenik E, Timashev P, Pinelis V, Surin A. Acute and Delayed Effects of Mechanical Injury on Calcium Homeostasis and Mitochondrial Potential of Primary Neuroglial Cell Culture: Potential Causal Contributions to Post-Traumatic Syndrome. Int. J. Mol. Sci. 2022;23:3858.
8. Bakaeva Z, Goncharov M, Frolov F, Krasilnikova I, Sorokina E, Zgodova A, Smolyarchuk E, Zavadskiy S, Andreeva L, Myasoedov N, Fisenko A, Savostyanov K. Regulatory Peptide Pro-Gly-Pro Accelerates Neuroregeneration of Primary Neuroglial Culture after Mechanical Injury in Scratch Test. Int. J. Mol. Sci. 2024;25:10886.
9. Лисина ОЮ, Московцев АА, Кубатиев АА, Сурин АМ. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018;62(2):11–23.
10. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004;86(2):279–351.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ NADPH-ОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Митрошина И.Ю.[1], Филина Ю.В.[2], Дюкина А.Р.[1], Сафронова В.Г.[1]

[1]Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия
[2]ФГАОУ ВО Казанский (Приволжских) федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Одним из основных защитных механизмов организма от инфекции является воспаление [1,2]. Оно как правило сопровождается гипертермией (повышением температуры тела до 37°С и выше). Реакция на повышение температуры представляет собой быстрое, но временное перепрограммирование клеточной активности, что обеспечивает выживание в период стресса, защищает основные компоненты клетки от теплового повреждения и позволяет быстро восстановить нормальную клеточную активность. Хроническое воспаление приводит к чрезмерной нагрузке на иммунную систему и как следствие к нарушению регуляции иммунных клеток, включая полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы). Важно понимать, какие механизмы регуляции участвуют в ответе иммунных клеток на повышение температуры, чтобы предвидеть его возможные последствия.

Известно, что патогенез сахарного диабета 2 типа (СД2Т) сопровождается хроническим воспалением с избыточным производством активных форм кислорода (АФК). Несмотря на то, что при диабете задействованы многочисленные источники АФК, фагоцитарная NADPH-оксидаза имеет решающее значение в воспалительных поражениях [3, 4]. Ранее было показано изменение активности этого фермента при тепловом стрессе [5, 6], что может приводить к избыточному или недостаточному производству АФК, нарушению метаболической регуляции и усугублению воспалительного процесса.

Фермент NADPH-оксидаза является белковым комплексом, структура ее компонентов и механизмы сборки исследуются продолжительное время, тем не менее уточнения вносятся до сих пор [7,8]. Представления о механизмах ее регуляции при гипертермии, ассоциированной с воспалительными процессами при СД2Т, на данный момент не сформированы. Несмотря на важнейшую роль NADPH-оксидазы имеется ограниченная информация о влиянии повышенной температуры на сигнальные пути, приводящие к активации-инактивации

NADPH-оксидазного комплекса [9]. Чаще всего исследования активности NADPH-оксидазы проводятся при комнатной или физиологической температуре (37°C) [например, 10, 11].

В связи с этим целью работы было сравнить уровни экспрессии генов субъединиц NADPH-оксидазы gp91phox, p47phox, p67phox в нейтрофилах крови здоровых доноров и пациентов с СД2Т в условиях физиологической и повышенной температур.

Методы. Объектом исследования служили нейтрофилы, изолированные из периферической крови человека. Образцы крови были получены от условно здоровых добровольцев, не имеющих установленного диагноза «сахарный диабет» и других заболеваний эндокринной системы (n=17), и от пациентов с верифицированным диагнозом СД2Т (n=18). Работа выполнена совместно с Больницей Пущинского научного центра РАН в соответствии с протоколом Локального этического комитета №2 от 10 апреля 2014 г. Нейтрофилы выделяли при помощи центрифугирования крови на градиенте плотности фиколла 1.077/1.119 г/мл. После двукратной отмывки в PBS от фиколла клетки ресуспендировали до плотности 10^7 клеток/мл в Henks $–Ca^{2+}$, содержащей 5.5 мМ *D*-глюкозы и хранили до начала эксперимента в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки инкубировали в течение 2 или 4 часов при 37°C и 40 °C. Также была взята проба без температурной инкубации (т.О).

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Тотальную РНК выделяли набором реагентов RNA Solo (Евроген, Россия). Уровни экспрессии мРНК субъединиц NADPH-оксидазы gp91phox *(CybB),* p47phox *(NCF1),* p67phox *(NCF2)* были количественно определены в ходе ПЦР с обратной транскрипцией. кДНК синтезировали из тотальной РНК с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия). Амплификацию и регистрацию результатов проводили при помощи системы DT-Light (ДНК-Технология, Россия).

Табл. 1. Праймеры, использованные для анализа экспрессии генов

Ген / продукт	Направ-ление	Последовательность 5’-3’	Транскрипт	Длина ампли-кона
NCF1 / p47phox	Прямой	GGTTCTGTCAGATGAAAGCAAAG	NM_000265.7	113
	Обратный	GTATGGCTCACCTGCATAGTT		
NCF2 / p67phox	Прямой	ATCCCAGCTCCTCCTAGTT	NM_000433.4	95
	Обратный	ACACTGAGCTTCACTTCCTTAG		
CybB / gp91phox	Прямой	GATGAGTCTCAGGCCAATCAC	NM_000397.4	95
	Обратный	TTGGGCCGTCCATACAAAG		
GAPDH / GAPDH	Прямой	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG	NM_002046.7	87
	Обратный	CGCCCCACTTGATTTTGGAG		

Для дизайна праймеров использовали веб-инструмент PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies, США). Синтез и очистка олигонуклеотидов проведены ООО «Евроген» (Россия). Последовательности и характеристики праймеров приведены в табл. 1.

Анализ проводили с использованием метода относительной нормализованной экспрессии ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$). В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Анализ продуктов амплификации методом электрофореза в 1% агарозном геле подтвердил специфичность флуоресцентного сигнала. Данные представлены в виде медианных значений с обозначением 25% и 75% квартилей. Для сравнения образцов использован Mann–Whitney U-test.

Результаты. Результаты показали, что исходные уровни экспрессии *CybB* в контрольной и исследуемой группах были сопоставимы и достоверно не отличались (рис. 1). В группе СД2Т наблюдалось значимое снижение уровня по сравнению с уровнем и исходном состоянии (т. О) при инкубации клеток в течение 2 и 4 часов при 37°С. В клетках контролей он не изменялся при этих условиях.

В контрольной группе увеличение температуры до 40°С значительно не повлияло на экспрессию исследуемого гена через 2 часа инкубации, но привело к ее значительному снижению по сравнению с исходным уровнем через 4 часа. Что касается исследуемой группы, то картина была противоположной: достоверное снижение по сравнению с исходным уровнем при инкубации нейтрофилов в течение 2 часов, а при 4-х часовой инкубации отличия нивелировались. Отметим, что при этом в клетках пациентов с СД2Т уровень был существенно выше, чем в клетках контролей.

В исходном состоянии уровни экспрессии гена *NCF1* не различались между группами. Статистически достоверное снижение экспрессии данного гена относительно исходного уровня наблюдалось в обеих группах в клетках, инкубированных в течение 2 или 4 ч при 37°С. При увеличении температуры инкубации до 40°С и инкубации в течение 2 или 4 часов экспрессия *NCF1* также была снижена в клетках контролей. В группе СД2Т при этих условиях не наблюдалось отличий от уровня в исходном состоянии.

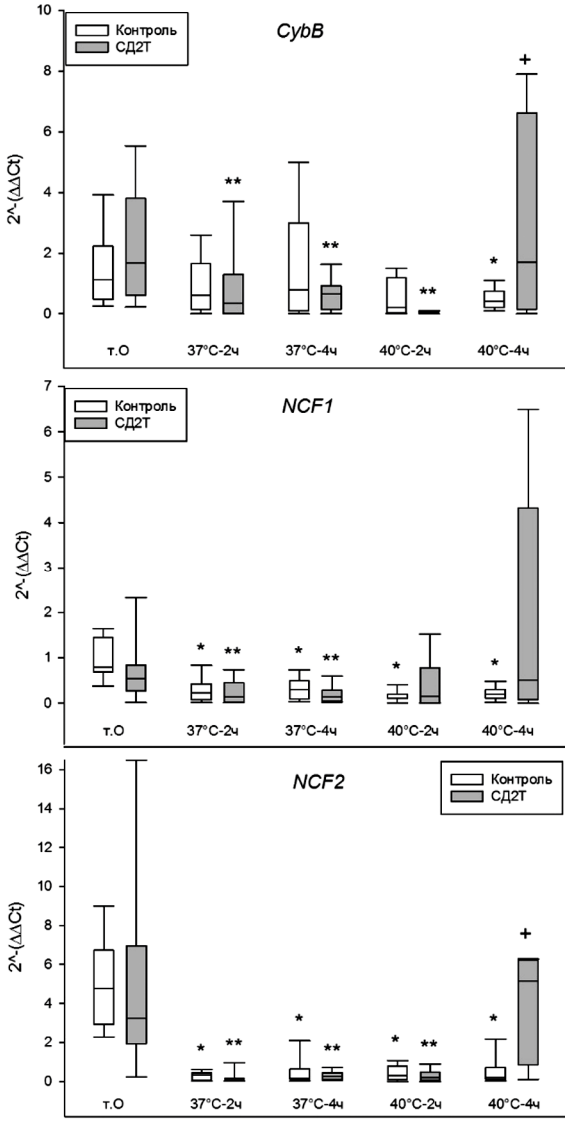


Рис. 1. Относительная нормализованная экспрессия *CybB, NCF1, NCF2.* * – по сравнению с т. О контроль. **- по сравнению с т. О СД2Т. + – по сравнению с т. 40°С – 4 ч контроль. P≤0.05.

В контрольной группе увеличение температуры до 40°С значительно не повлияло на экспрессию исследуемого гена через 2 часа инкубации, но привело к ее значительному снижению по сравнению с исходным уровнем через 4 часа. Что касается исследуемой группы, то картина была противоположной: достоверное снижение по сравнению с исходным уровнем при инкубации нейтрофилов в течение 2 часов, а при 4-х часовой инкубации отличия нивелировались. Отметим, что при этом в клетках пациентов с СД2Т уровень был существенно выше, чем в клетках контролей.

В исходном состоянии уровни экспрессии гена *NCF1* не различались между группами. Статистически достоверное снижение экспрессии данного гена относительно исходного уровня наблюдалось в обеих группах в клетках, инкубированных в течение 2 или 4 ч при 37°С. При увеличении температуры инкубации до 40°С и инкубации в течение 2 или 4 часов экспрессия *NCF1* также была снижена в клетках контролей. В группе СД2Т при этих условиях не наблюдалось отличий от уровня в исходном состоянии.

Уровни экспрессии гена *NCF2* в исходном состоянии клеток доноров обеих групп не различались. Наблюдалось достоверное понижение уровней экспрессии гена *NCF2* относительно исходного как в контрольной, так и в исследуемой группах. Инкубация при 37°С в течение 2 или 4 часов, а также при 40°С в течение 2 часов привела к снижению этих значений в обеих группах. Различие между группами наблюдалось через 4 часа при 40°С: пониженный уровень в контроле, а в нейтрофилах пациентов с СД2Т достоверное повышение относительно уровня в контрольной группе и близкое по значению, регистрируемому в нулевой точке.

Отметим, что наблюдается общая тенденция по снижению уровней экспрессии по сравнению с нулевой точкой за исключением характерного для *NCF2* восстановления уровня экспрессии в группе СД2Т в точке 40°С-4 часа до исходных значений в т. О.

Обсуждение. NADPH-оксидаза нейтрофилов представляет собой многокомпонентный комплекс, который в активированном состоянии включает трансмембранный флавоцитохром *b558*, состоящий из двух субъединиц gp91phox и p22phox, цитозольные белковые факторы p47phox, p67phox и p40phox, а также малые ГТФ-азы. Мембранные и цитозольные структурные компоненты фермента поддерживаются физически диссоциированными в неактивном состоянии клетки при отсутствии микробной инфекции или иного активатора. Активация сопровождается транслокацией регуляторных субъединиц к мембране, где они образуют комплекс с флавоцитохромом *b558*. В нормальных условиях эти механизмы обеспечивают точную регуляцию активности фермента и предотвращают избыточное образование супероксида.

При температуре 37°C и выше активность NADPH-оксидазы в интактных нейтрофилах подавлена [12], что снижает потребность в синтезе дополнительных структурных компонентов и, вероятно, уменьшает активность соответствующих генов. Пониженные уровни экспрессии NCF1 и NCF2, которые мы регистрируем в условиях 37°C – 2 и 4 часа, могут являться следствием температурной инактивации фермента. Сборка комплекса NADPH-оксидазы в нейтрофилах обратимо нарушается при температуре выше 40°C из-за нарушения функции цитоскелета, что приводит к снижению подвижности и скорости образования псевдоподий [13]. Возможно, в этот процесс также может быть вовлечена экспрессия генов, так как по нашим результатам как в контрольной группе, так и при СД2Т наблюдалось понижение уровней экспрессии генов субъединиц p47phox и p67phox по сравнению с исходными уровнями в условиях 40°C-2 часа, а понижение экспрессии гена субъединицы gp91phox только для СД2Т. В отличие от клеток контролей, которые отвечают снижением экспрессии при 40°C-2 часа, клетки пациентов с СД2Т отвечают ее усилением, что может приводить к повышенной экспрессии белковых компонентов фермента и повышенной генерации АФК при СД2Т. Так обнаружено, что в эозинофилах, стимулированных форболовым эфиром, увеличение температуры до 40°C привело к сборке дополнительных NADPH-оксидазных комплексов [11]. Возможно, что повышение экспрессии всех генов в точке 40°C-4 часа в нейтрофилах создает условия для формирования дополнительных комплексов NADPH-оксидазы при СД2Т, при котором стимулирующим фактором выступает повышенный уровень глюкозы.

Полученные результаты дополняют представление о реакциях, связанных с NADPH-оксидазой при тепловом воздействии на нейтрофилы человека.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 22-15-00215.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuprash DV., Nedospasov SA. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. Biochemistry (Moscow). 2016; 81:1237-1239.
2. Souabni H, Wien F, Bizouarn T, Houee-Levin C, Refregiers M, Baciou L. The physicochemical properties of membranes correlate with the NADPH oxidase activity. Biochim Biophys Acta - Gen. Subj. 2017;1861(1B):3520-3530.
3. Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, Shasha SM, Shapiro G, Nassar L, Kristal B. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. Diabetes Care. 2001;24:104-110.
4. Dikalov S. Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic. Biol. Med. 2011;51:1289-1301.

5. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Mrad MB, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. Int J Hyperther. 2014;30(7):513-523.
6. Yu T, Dohl J, Wang L, Chen Y, Gasier HG, Deuster P. Curcumin ameliorates heat-induced injury through NADPH oxidase-dependent redox signaling and mitochondrial preservation in C2C12 myoblasts and mouse skeletal muscle. J. Nutr. 2020;150(9):2257-2267.
7. Nocella C, D'Amico A, Cammisotto V, Bartimoccia S, Castallani V, Loffredo L, Marini L, Ferrara G, Testa M, Motta G, Benazzi B, Xara F, Frati G, Sciarretta S, Pignatelli P, Violi F, Carnevale R, Group S. Structure, Activation, and Regulation of NOX2: At the Crossroad between the Innate Immunity and Oxidative Stress-Mediated Pathologies. Antioxidants. 2023;12(2),429.
8. Liu X, Shi Y, Liu R, Song K, Chen L. Structure of human phagocyte NADPH oxidase in the activated state. Nature. 2024;627:189-195.
9. Tikhonova IV, Grinevich AA, Kosyakova NI, Safronova VG. The effect of high temperature on kinetics of reactive species generation in patients with type 2 diabetes. Free Radical Biol Med. 2022;192:235-245.
10. DeCoursey TE, Cherny VV, Zhou W and Thomas LL. Simultaneous activation of NADPH oxidase – related proton and electron current in human neutrophils. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(12):6885-6889.
11. Morgan D, Cherny VV, Murphy R, Xu W, Thomas LL, DeCoursey TE. Temperature dependence of NADPH oxidase in human eosinophils. J Physiol. 2003;550:447-458.
12. Maridonneau-Parini I, Malawista SE, Stubbe H, Russo-Marie F, Polla BS. Heat shock in human neutrophils: Superoxide generation is inhibited by a mechanism distinct from heat-denaturation of NADPH oxidase and is protected by heat shock proteins in thermotolerant cells. J Cell Phisiol. 1993;156(1):204-211.
13. Pramanik T, Thapa M, Saikia, TC. Effect of temperature on phagocytic activity of neutrophils. Nepal Med Coll J. 2004;6:39-40.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИРУВАТА В ТОКСИЧЕСКОЙ ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Надеев А.Д., Федотова Е.И., Крицкая К.А., Бережнов А.В.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся избирательным поражением дофаминовых нейронов среднего мозга, что проявляется в двигательных нарушениях. Существующие терапевтические возможности обычно ограничиваются симптоматическими препаратами. Первопричины развития БП малоизвестны. БП имеет как наследственные, так и спорадические формы. При этом аномальное функционирование митохондрий считается конвергентной точкой в процессах гибели нейронов. Нормальное функционирование митохондрий в клетке обеспечивается работой всех элементов так называемой «системы качества митохондрий», включающей протеостаз, биогенез, динамику и селективную деградацию нефункциональных митохондрий – митофагию.

Безопасные способы активации митофагии в настоящее время привлекают особое внимание исследователей из-за возможного защитного эффекта при различных патологиях [1-3]. Практически исключительным нетоксичным способом инициации митофагии является временное подкисление внутриклеточной среды, поскольку в каскадах митофагии также обнаружены pH-чувствительные элементы [4]. В предыдущих исследованиях нам удалось описать нетоксичные соединения, а именно лактат натрия и пируват натрия, способные инициировать митофагию через закисление цитозоля [5,6]. Конечно, нейропротекторное действие пирувата изучается давно, однако в качестве активатора митофагии он практически не рассматривался.

Кроме этого, согласно литературным данным вдыхание высокой концентрации CO_2 вызывает состояние гиперкапнии в организме и приводит к транзиторному ацидозу в клетках головного мозга [7], что, как известно, способно активировать митофагию. В связи с этим нами был предложен и успешно опробован этот подход в качестве терапевтического [8].

Целью данной работы было исследование механизмов нейропротекторного действия пирувата и принудительной гиперкапнии на животной модели БП.

Материалы и методы. Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6 10-12 недельного возраста. В качестве животной модели

БП производилось в/б введение нейротоксина MPTP (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) в суммарной дозе 80 мг/кг веса. В качестве терапевтических процедур производилось 1) в/б введение пирувата натрия в дозе 250 мг/кг 4 раза/нед, 2) двухминутная принудительная ингаляция 20% CO_2 3 раза/нед. Для оценки моторных функций применяли тесты «шест», «сужающаяся дорожка», «цилиндр» после 10 дней экспериментального лечения. Для определения уровня экспрессии целевых генов в образцах стриатума мышей тотальную РНК выделяли с использованием коммерческого набора ExtractRNA (Евроген). Концентрацию полученной РНК измеряли спектрофотометрически при 260 нм. Для синтеза комплементарной ДНК использовали обратную транскриптазу MMLV (Евроген). Полученные образцы использовали для проведения ПЦР в реальном времени на амплификаторе DTlite (ДНК-Технология). Относительные уровни экспрессии рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где в качестве референсного гена использовали ген *Gapdh*.

Результаты и обсуждение. Для оценки эффективности терапевтических подходов мы проводили поведенческие тесты, чувствительные к моторной дисфункции, характерной для БП. Поведение оценивали в относительных единицах по шкале от 1 до 4, где 4 – животное полностью справилось с заданием [9]. Из результатов, представленных на рис. 1, видно, что при введении MPTP животные утрачивают двигательные навыки и координацию.

Терапевтическая процедура, заключавшаяся во в/б введении пирувата натрия, показала восстановление моторных навыков, также как и совместное действие принудительной гиперкапнии и введение пирувата натрия. Основной задачей данного исследования было выяснение механизмов, лежащих в основе нейропротекторного потенциала этих терапевтических подходов в контексте возможной активации митофагии.

Для этого методом ПЦР-анализа мы оценили изменение уровней экспрессии генов, контролирующих процессы ауто/митофагии. Было показано, что при действии пирувата натрия наблюдается увеличение экспрессии гена *Pink1*, ответственного за Pink1/Parkin-опосредованный путь митофагии, генов, кодирующих убиквитин-лигазы E3: Mul1, Arih1, адаптерные белки: p62, Opteneurin, белки, формирующие аутофагосому: LC3, PI3K, Atg7, в токсической MPTP-индуцированной модели БП (рис. 2). Также было отмечено увеличение уровней мРНК генов, ответственных за рецептор-опосредованную митофагию, таких как *Bnip3, Nix, Fundc1*.

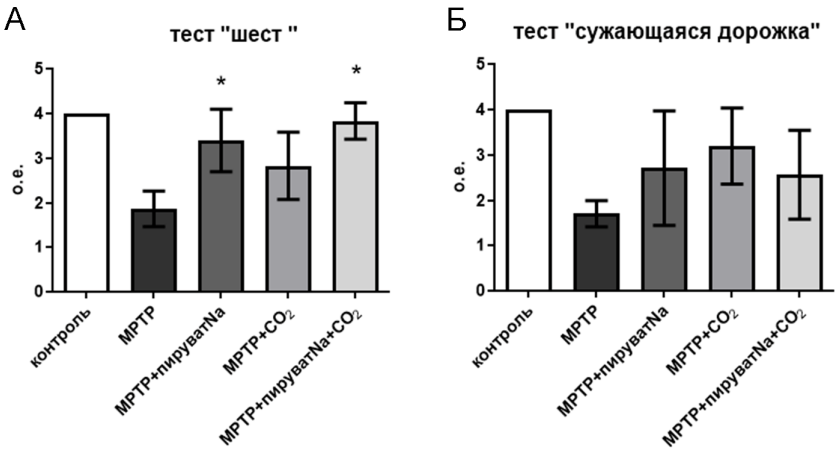


Рис. 1. Влияние пирувата натрия, CO_2 и их совместного действие на уровень моторных навыков (А – тест «вертикальный шест»; Б – тест «сужающаяся дорожка») у мышей с токсической моделью БП, вызванной действием МРТР. Результаты представлены в относительных единицах (о.е.) в виде: среднее ± стандартное отклонение, n = 5–7. * $p < 0.05$, относительно группы МРТР (без лечения).

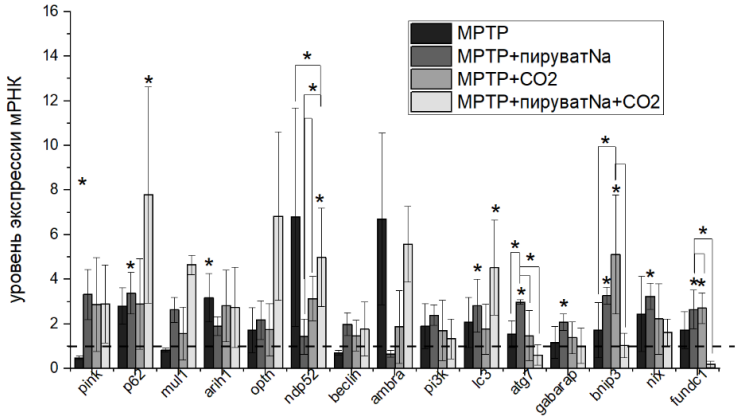


Рис. 2. Влияние пирувата натрия, CO_2 и их совместное действие на уровень экспрессии мРНК генов-маркеров митофагии у мышей с токсической моделью БП, вызванной действие МРТР. Каждый столбец – среднее ± стандартное отклонение, n = 4–6. Результаты представлены относительно референсного гена *Gapdh* и контроля (без воздействий). Контроль представлен в виде пунктирной линии. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ относительно контроля.

Состояние гиперкапнии у мышей с МРТР-индуцированной моделью БП вызывает увеличение экспрессии генов, участвующих в процессе митофагии: *Pink1, p62, Arih1, Ndp52*, а также значительно изменяются уровни мРНК: *Bnip3, Nix, Fundc1*.

Совместное воздействие пирувата натрия с CO_2, оказываемое на животных с токсической моделью БП, приводит также к увеличению экспрессии генов, ответственных за активацию митофагии в клетках (*Pink1, p62, Mul1, Arih1, Optineurin, Ndp52, Ambra1, LC3*). Кроме того, в этом случае не наблюдалось увеличение экспрессии генов, участвующих в рецептор-опосредованной митофагии.

Следует отметить, что МРТР способен сам в какой-то степени активировать митофагию, о чем свидетельствует увеличение уровней мРНК некоторых генов-маркеров митофагии (*p62, Arih1, Nix*). Этот эффект наблюдался нами ранее на нейрон-глиальной культуре клеток гиппокампа крысы и нейробластоме [5].

Заключение. Полученные данные указывают на то, что на животной модели БП терапевтические эффекты пирувата и гиперкапнии реализуются через активацию процесса митофагии в клетках среднего мозга.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-24-00501 (https://rscf.ru/project/25-24-00501/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hong WL, Huang H, Zeng X, Duan CY. Targeting mitochondrial quality control: new therapeutic strategies for major diseases. *Mil Med Res.* 2024;11(1):59.
2. Masaldan S, Callegari S,DewsonG.Therapeutic targeting ofmitophagy in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans.* 2022;50(2):783–797.
3. Pavlova JA, Guseva EA, Dontsova OA, Sergiev PV. Natural activators of autophagy. *Biochem Mosc*. 2024;89(1):1–26. doi:10.1134/S0006297924010012.
4. Freeman SA, Grinstein S, Orlowski J. Determinants, maintenance, and function of organellar pH. *Physiol Rev.* 2023;103(1):515–606.
5. Fedotova EI,Dolgacheva LP, Abramov AY, Berezhnov AV. Lactate and pyruvate activate autophagy andmitophagy that protect cells in toxic model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*. 2022;59(1):177–190.
6. Kritskaya KA, Fedotova EI, Nadeev AD, Berezhnov AV. «Silver Bullet of Acidification»: Studying Anti-PD Neuroprotective Mechanisms of Transient pH-Decrease. *BIOCELL.* 2025;49(3):451–464.
7. Magnotta VA, Heo HY, Dlouhy BJ et al. Detecting activity–evoked pH changes in human brain. *PNAS USA.* 2012;109:8270–8273.
8. Nadeev AD, Kritskaya KA, Fedotova EI, Berezhnov AV. «One Small Step for Mouse»: High CO2 Inhalation as a New Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease. *Biomedicines.* 2022;10(11):2832.
9. Fleming SM, Ekhator OR, Ghisays V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp.* 2013;76:50303.

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР РОСТА ИЗМЕНЯЕТ РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Никитина Е.Р., Захарова И.О., Баюнова Л.В., Шуколюкова Е.П., Чеботарева М.А., Катюхин Л.Н.

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

Введение. Нарушение мозгового кровообращения остается одним из самых значимых заболеваний за последнее десятилетие. Способность эритроцитов транспортировать кислород зависит от многих факторов, в том числе и от способности мембраны к деформации. При различных заболеваниях, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, а также в условиях ишемии происходит нарушение реологических свойств крови, что играет важную роль в патогенезе этих заболеваний [1]. Для изучения деформационных свойств эритроцитов используется метод осмотической градиентной эктацитометрии, который позволяет определять не только деформируемость эритроцитов, но также состояние гидратации и диапазон осмотической устойчивости клеток. Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) синтезируется и секретируется печенью под действием гормона роста гипоталамуса и играет важную роль в защите клеток от гипоксии, ишемии и окислительного стресса, а также является многофункциональным регулятором клеточной пролиферации. Достаточное количество работ указывает на то, что IGF-1 защищает от эндотелиальной дисфункции, развития атеросклеротических бляшек, метаболического синдрома, клинической нестабильности и ишемического повреждения миокарда [2,3]. IGF-1 также оказывает множественное воздействие на мозг, в том числе нейропротекторное при ишемии головного мозга и инсульте [4]. Однако, до сих пор не было исследовано влияние IGF1 на реологические свойства крови. Поэтому целью данной работы было изучение деформационных свойств эритроцитов и гематологических индексов у крыс линии Wistar с ишемией/реперфузией головного мозга при лечении с помощью препарата IGF1.

Методы исследования.

1. Моделирование ишемии/реперфузии головного мозга у крыс. Двухсосудистую ишемию переднего мозга вызывали у крыс линии Wistar путем окклюзии каротидных артерий в течение 10 мин в сочетании с контролируемой гипотензией (50 мм Hg). После окончания окклюзии разжимали сосуды, возвращали кровь в кровяное русло и проводили реперфузию мозга в течение 60 мин.

2. Введение IGF1. IGF1 в дозе 0.5 МЕ вводили крысам

интраназально за 1 ч до окклюзии. По окончании реперфузии проводили забор крови.

3. Реологические исследования. Деформационные свойства эритроцитов изучались методом градиентной эктацитометрии в условиях осмотического градиента от 125 мосмоль/кг H_2O до 525 мосмоль/кг H_2O при постоянном напряжении сдвига 1 и 20 Па (Т 37°С). Этот метод позволяет определять деформируемость эритроцитов, осмотическую хрупкость и состояние клеточной гидратации [5-7].

4. Гематологические исследования. Образцы крови анализировали на автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800Vet (Mindray) со стандартной калибровкой согласно инструкции производителя. Измерялись следующие параметры крови: количество эритроцитов (RBC), концентрация гемоглобина (Hb), объем гематокрита (HCT), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC), стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (RDW-SD) и коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов (RDW-CV).

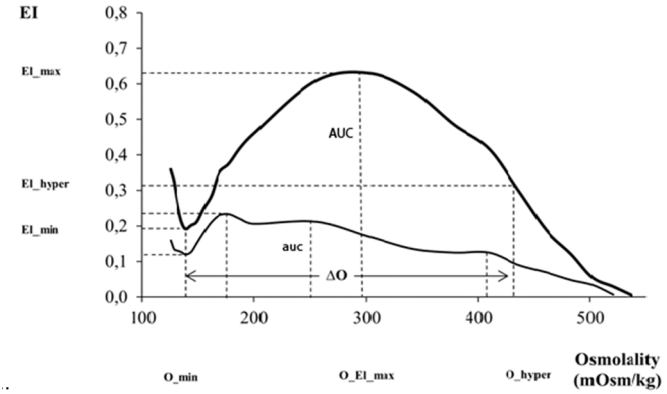


Рис. 1. Схематическое изображение осмоскана и его параметров. Верхняя кривая – осмоскан, снятый при высоком напряжении сдвига – 20 Па, нижняя кривая – осмоскан, снятый при низком напряжении сдвига 1 Па.

Результаты. Осмотическая градиентная эктацитометрия является общепризнанным методом измерения деформационных свойств эритроцитов при непрерывном изменении осмоляльности при различных напряжениях сдвига (от 0.5 до 30 Па). Результатом анализа является профиль осмотической деформируемости эритроцитов – осмоскан, который характеризует изменение индекса деформируемости в

зависимости от осмоляльности суспензионной среды и имеет несколько характеристических точек (Рис. 1).

На Рис. 1 изображен типичный осмоскан эритроцитов крыс со следующими параметрами:

EI max – максимальный индекс удлинения, соответствует максимальной деформируемости эритроцита.

EI min – значение EI в точке изотропного набухания эритроцита, является мерой степени водной проницаемости или целостности мембраны [8].

O_E_min – осмоляльность, при которой отмечается минимальная величина EI в гипоосмолярной области и соответствует осмолярности, при которой 50% эритроцитов гемолизируются в стандартном тесте осмотической хрупкости.

O_EI_max – осмоляльность (мосмоль/кг H_2O), при которой наблюдается наивысшее значение EI, который соответствует изотоничному значению крови.

O hyper – состояние гидратации клеток (степень гидратированности гемоглобина) или внутренней вязкости эритроцита, значение которого соответствует гипертонической осмолярности, где EI составляет 50% от EI_max.

Δ O – разница между значениями осмоляльности при максимальном (O_hyper) и минимальном (O_min) EI [9], осмотический диапазон устойчивости эритроцитов, позволяет оценивать резистентность мембран эритроцитов к осмотическому лизису.

Auc – площадь под кривой, является косвенным показателем деформируемости эритроцитов.

Деформируемость эритроцитов крыс линии Wistar, подвергшихся ишемии/реперфузии (I/R) головного мозга, имеет существенные отличия от результатов ложно-оперованных крыс (ShO – sham- operated rats), соответствующие степени тяжести патологии. С помощью метода эктацитометрии при высоком напряжении сдвига (20 Па) мы показали, что при I/R происходит значительное снижение индекса деформируемости эритроцитов (EImax) (0.516±0.008 усл.ед.) относительно показателей ShO крыс (0.546±0.009 усл.ед.) ($p<0.005$) (Рис.2, Табл.1). Косвенным указанием на это также служит уменьшение площади под кривой (Auc): 109±10 и 126±4 усл.ед. для крыс с I/R и ShO особей, соответственно. При этом у крыс после I/R происходит достоверное по сравнению с ShO особями снижение гидратации клеток (O_hyper) с 438±13 (ShO) до 405±8 усл.ед. (I/R) ($p<0.05$) и диапазона осмотической устойчивости эритроцитов (ΔO) с 283±10 до 253±10 усл.ед., соответственно ($p<0.05$).

Интраназальное введение IGF1 до эпизода ишемии/реперфузии повышает деформируемость эритроцитов с 0.516±0.008 до значений у ShO особей (0.544±0.020 усл.ед.) ($p<0.01$), а также улучшает осмотическую стойкость эритроцитов (Ohyper) (405±8 и 427±6 усл.ед., соответственно), ($p<0.005$). Резистентность мембран эритроцитов к осмотическому лизису (ΔO) имеет тенденцию к увеличению.

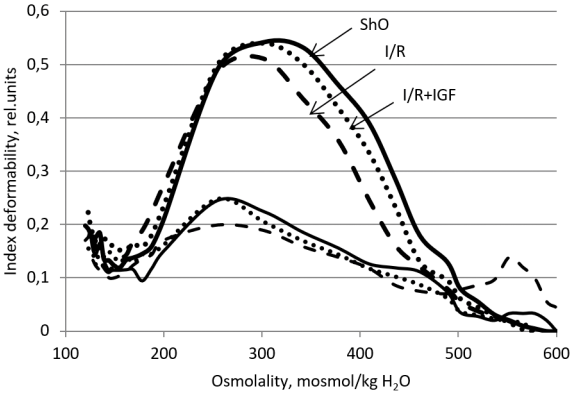


Рис. 2. Осмоскан эритроцитов крысы (n=6), снятый при напряжении сдвига 20 Па (верхние кривые) и при напряжении сдвига 1 Па (нижние кривые). ShO – ложно-оперированные крысы, I/R – ишемия/реперфузия; I/R+IGF1 – ишемия/реперфузия+инсулиноподобный фактор роста-1.

Измерения, проведенные при низком напряжении сдвига (1 Па) показали снижение водной проницаемости мембран (EImin) при I/R (0.096±0.018 усл.ед.) по сравнению с ShO крысами (0.119±0.004 усл.ед.) ($p<0.05$). Также достоверно снижалась площадь под кривой нижнего осмоскана (auc) с 54±2 до 47±6 ($p<0.05$). При введении IGF1 происходит восстановление водной проницаемости до значений у ShO животных и даже превышение их до 0.144±0.007 усл.ед. ($p<0.005$).

В таблице 1 представлены данные осмосканов, полученные с помощью метода осмотической градиентной эктацитометрии и снятые при напряжении сдвига 1 и 20 Па.

Табл. 1. Параметры осмосканов, снятые при низком (1 Па) и высоком (20 Па) напряжении сдвига.

Группы	EI_{max}	EI_{min}	ei_{min}	$O_{min}(EI_{min})$	$O_{max}(EI_{max})$	O_{hyper}	ΔO	AUC	auc
	relative units			mOsm/kg H_2O				relative units	
ShO	0.546 ±0.009	0.119 ±0.004	0.093 ±0.007	155 ±3	316 ±9	438 ±13	283 ±10	126 ±4	54 ±2
I/R	0.516 ±0.008	0.096 ±0.018	0.093 ±0.022	152 ±9	288 ±14	405 ±8	253 ±10	109 ±10	47 ±6
I/R+IGF	0.544 ±0.020	0.144 ±0.007	0.103 ±0.008	162 ±19	295 ±15	427 ±6	265 ±12	118 ±5	55 ±3

Вместе с изучением деформационных свойств эритроцитов нами были проведены исследования гематологических индексов (Табл.2). Как видно из таблицы, при I/R снижается количество эритроцитов (RBC), гемоглобин (Hgb) и гематокрит (HCT), также достоверно снижается и количество тромбоцитов (484±12) по сравнению с ShO особями (756±21) ($p<0.05$). Введение инсулиноподобного фактора роста IGF1 не влияет на количество эритроцитов, гемоглобин и гематокрит, однако двукратное увеличении количества тромбоцитов (885±27) ($p<0.05$), а также изменяется (увеличивается) ширина распределения эритроцитов (RDWSD).

Табл. 2. Гематологические индексы.

	RBC ($x10^{12}$/л)	HGB (г/л)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (г/дл)	PLT (кл/мкл)	RDWCV (%)	RDWSD (fl)
ShO	8,8	146	42	48	16,7	347	756	12,6	24,1
I/R	7,7	130	37	48,1	17,3	351	484	13,6	26
I/R+IGF	7,2	130	36	50,4	18,1	358	885	13,4	27

Обсуждение результатов. Реологические свойства крови определяются рядом факторов и их изменение может служить диагностическим признаком многих заболеваний. Хорошо известно, что во время I/R помимо местных физических и метаболических изменений индуцируются различные пути высвобождения свободных радикалов, что может нанести вред эритроцитам, увеличивая их жесткость и ухудшая их деформируемость [10]. Многочисленные исследования показывают, что IGF-1 обладает антиатерогенным действием благодаря своему многогранному воздействию на факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний. Ключевую роль в этих действиях играет метаболическая способность IGF-1 сочетать расширение сосудов с улучшением их

функции [11,12]. И, хотя в экспериментах на животных и клеточных культурах было показано, что IGF-1 в условиях гипоксии улучшает энергетический обмен в нейронах и глиальных клетках и оказывает положительное влияние на микроциркуляцию крови в мозге, до сих пор не проводилось изучение влияния IGF1 на реологические свойства крови, в частности, на деформационные свойства эритроцитов.

При исследовании деформационных свойств эритроцитов во время I/R нами было установлено снижение индекса деформируемости (EImax). При этом происходило снижение гидратации клеток (O_hyper) и диапазона осмотической устойчивости эритроцитов (ΔO). Введение IGF1 до эпизода I/R повышало деформируемость эритроцитов до значений у ShO особей, а также улучшало осмотическую стойкость эритроцитов (Ohyper).

Гематологические параметры также претерпевали изменения при I/R – снижалось количество эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Снижение этих значений связано не только с И/Р-повреждением, но и с кровопотерей, вызванной хирургическим вмешательством и забором крови. Также снижалось и количество тромбоцитов. Такие изменения могут быть связаны с воспалительными процессами и реакциями острой фазы, вызванными I/R. При введении IGF1 изменения затрагивали только количество тромбоцитов – они повышались до контрольных значений и даже превышали их. В целом, на основании полученных данных можно заключить, что IGF1 положительно влияет на сниженную при I/R деформируемость эритроцитов, восстанавливая ее до значений у ShO особей.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00263-25-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. E Kayar , F Mat, H J Meiselman, O K Baskurt.. Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury Biorheology. 2001;38(5-6):405-14
2. Jun l.A., Scheike T., Davidsen M., Gyllenborg J., Jorgensen T. Low serum insulin-Like growth factor-I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population case-control study. Circulation. 2002; 106 (8): 939–944.
3. Ahmad Serhan, Joeri L Aerts, Erik W G M Boddeke, Ron Kooijman. Neuroprotection by Insulin-like Growth Factor-1 in Rats with Ischemic Stroke is Associated with Microglial Changes and a Reduction in Neuroinflammation.Neuroscience. 2020. 1:426:101-114. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.11.035.
4. Inna I Zorina, Natalia F Avrova, Irina O Zakharova, Alexander O Shpakov. Biochemistry (Mosc). 2023 Mar;88(3):374-391.Prospects for the Use of Intranasally

Administered Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 in Cerebral Ischemia
5. Clark, M. R., Mohandas, N., and Shohet, S. B. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. Blood. 1983. Vol. 61. P. 899-910. https://doi.org/10.1182/blood.V61.5.899.899
6. Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Mohandas, N. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: assessment of a new generation ektacytometer. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2016. Vol. 56(1). P. 9-22.
7. Llaudet-Planas, E., Vives-Corrons, J. L., Rizzuto, V., Gómez-Ramírez, P., Sevilla Navarro, J., Coll Sibina, M. T., Mañú-Pereira, M. M. Osmotic gradient ektacytometry: a valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. Int. J. Lab. Hematol. 2018. Vol. 40(1). P. 94-102.
8. Katiukhin L.N. A Method for evaluation of membrane permeability for water by the erythrocyte osmotic deformability profiles // Bull. Experim. Biol. and Med. 2014. Vol. 157. P. 116-118. DOI: 10.1007/s10517-014-2505-1.
9. Nemeth N, Kiss F, Miszti-Blasius K.Scand. Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: a comparative study for methodological standards. J Clin Lab Invest. 2015 May;75(3):213-22. doi: 10.3109/00365513.2014.993695.
10. Трофимов АВ, Карасев АА, Власова ТИ. Изменение кислородтранспортной способности гемоглобина больных с ишемическим инсультом. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2023;22(4):50–55. http://doi.org/10.24884/1682-6655-2023-22-4-50-55.
11. Elena Conti, Maria Beatrice Musumeci, Marco de Giusti, Eleonora Dito, Vittoria Mastromarino, Camillo Autore, Massimo Volpe. 377 IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy. Clinical Science (2011) 120, 377–402 doi:10.1042/CS20100400
12. Abbas A, Grant PJ, Kearney MT. Role of IGF-1 in glucose regulation and cardiovascular disease. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2008 Sep;6(8):1135-49. doi: 10.1586/14779072.6.8.1135.

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ГЕНЕРАЦИИ АФК У МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Сафронова В.Г., Дюкина А.Р.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия

Введение. Среди патогенетических факторов сахарного диабета 2 типа (СД2Т), широко распространенного заболевания, связанного с нарушениями метаболизма, рассматриваются активные формы кислорода (АФК), источниками которых могут быть активированные фагоциты. Для изучения этиологии СД2Т привлекаются модели заболевания на животных, наиболее часто используется модель с ожирением при содержании животных на высококалорийной диете. Ранее мы показали, что кинетика генерации АФК, зависимой от NADPH оксидазы, у таких мышей отличается от кинетики у мышей, потребляющих стандартный корм [1]. Нарушения имели сходство и различия с нарушениями у больных СД2Т [2].

В данной работе проведен анализ кинетики генерации АФК фагоцитами у мышей линии C57BL/KS-Leprdb/+m с мутацией гена рецептора лептина (LEPR), которая приводит к ожирению и развитию СД2Т у гомозиготных особей (модель db/db). Ген LEPR выделяется как особенно значимый среди множества генов, связанных с повышенной предрасположенностью к развитию СД2Т [3]. Считается, что последовательность событий в db/db модели сходна с развитием заболевания у человека [4]. Сведения о функции NADPH оксидазы у db/db мышей имеют противоречивый характер: показано, что нейтрофилы из очага воспаления не продуцировали супероксид при стимуляции из-за отсутствия интактной субъединицы фермента p47phox [5], тогда как в клетках сосудов обнаружена значительно повышенная экспрессия изоформ NOX1/2/4, приводящая к системному и сосудистому окислительному стрессу наряду с другими факторами [6,7]. Поэтому вопрос о нарушениях генерации АФК при СД2Т остается актуальным.

Методы. В работе использованы гомозиготные мыши-самцы линии C57BL/KS-Leprdb/+m (db/db модель), полученные из филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России». По фенотипу, физиологическим и биохимически параметрам животные соответствовали характеристикам:

ожирение, метаболический синдром, СД2Т. Контролем служили мыши линии C57BL/6J того же возраста. Протокол экспериментов одобрен Комиссией по биоэтике ИБК РАН (№ 26/032024 от 01.03.2024). Животные потребляли стандартный корм и имели свободный доступ к питью. В каждой группе животные случайным образом были разделены на 3 подгруппы с потреблением воды без добавок, с добавкой L-аргинина (70 мг/мл) или метформина (5 мг/мл): подгруппы «вода», «L-аргинин» или «метформин», соответственно. Полученные дозы добавок не различались между группами: контрольные и db/db мыши потребляли в среднем 21.1±0.6 и 18.2±0.9 мг/кг/сутки L-аргинина, или 1.4±0.1 и 1.1±0.1 мг/кг/сутки метформина, соответственно, в течение четырех недель. Предполагалось, что L-аргинин, улучшающий усвоение глюкозы [8], и метформин, повышающий чувствительность рецепторов к инсулину [9], повлияют на кинетику генерации АФК фагоцитами животных с мутацией, приведшей к ожирению и СД2Т.

Кинетика генерации АФК в ответ на опсонизированный зимозан (ОЗ) в диапазоне доз 15.6-250 мкг/мл исследована на пробах нефракционированной периферической крови с помощью хемилюминесцентного анализа. Регистрация интенсивности хемилюминесценции проведена последовательно от 12 проб (2 повтора для разных условий) с интервалом 2.5 с при 37ºС. Рассчитаны базовый уровень, лаг-период, скорость развития и амплитуда ответа, время до максимума (Тмакс), продукция АФК (за 1000 с). Согласно математической модели, кинетические параметры ответа связаны с определенными механизмами, регулирующими активацию NADPH оксидазы при фагоцитозе ОЗ [2].

Результаты и обсуждение. Базовый уровень генерации АФК не различался между контрольными и db/db мышами во всех подгруппах, но в группе с СД2Т он был ниже у мышей, потреблявших L-аргинин, по сравнению с таковым у мышей из двух других подгрупп.

Кинетические параметры ответов зависели от концентрации ОЗ: лаг-период и время до максимума ответа (Тмакс) уменьшались с увеличением дозы; скорость развития ответа, амплитуда и продукция АФК, напротив, возрастали.

В подгруппе «вода» лаг-период при СД2Т был больше чем в контроле со значимыми различиями при дозе ОЗ 250 мкг/мл. При этой дозе в контрольной группе параметр изменялся в подгруппах: «L-аргинин» > «метформин» и «вода», а также при дозе 125 мкг/мл: «L-аргинин» > «метформин». При СД2Т различия между значениями данного параметра в подгруппах не обнаружены.

Скорость развития ответа в подгруппе «вода» была несколько выше у db/db мышей, но без достоверных различий, в подгруппе «L-аргинин»,

различия между контролем и СД2Т были значимыми для доз 125 и 250 мкг/мл. В контрольной группе не наблюдалось значимого действия веществ, тогда как в группе СД2Т в подгруппе «метформин» при дозе 125 мкг/мл скорость развития ответа была значимо ниже по сравнению с параметром в подгруппе «L-аргинин». Таким образом, аргинин не уменьшал высокую скорость развития ответа на ОЗ у db/db мышей, тогда как метформин способствовал уменьшению скорости развития ответа и приближал его к уровню у контрольных мышей.

Время до максимума ответа (Тмакс) на ОЗ в разных концентрациях в крови животных, потреблявших воду без добавок, не различалось между группами. В контрольной группе потребление L-аргинина приводило к увеличению параметра (значимо в ответ на 62.5 мкг/мл ОЗ), тогда как в подгруппе «метформин» Тмакс было короче, чем в подгруппе «L-аргинин» и не отличалось от значений в подгруппе «вода». В крови db/db мышей значения Тмакс не различались между подгруппами «вода» и «L-аргинин», но были ниже в подгруппе «метформин» чем в подгруппе «L-аргинин». Ни в одной из подгрупп нет различий между Тмакс ответов фагоцитов в крови контролей и db/db мышей.

В контрольной группе потребление мышами L-аргинина или метформина не влияло на амплитуду ответов. В крови мышей с СД2Т в подгруппе «L-аргинин» амплитуды были выше, чем в подгруппах «вода» и «метформин», а также в этой же подгруппе у контрольных животных. Также у животных с СД2Т, потреблявших метформин, амплитуды были ниже, чем в подгруппе «вода».

Продукция АФК в контрольной группе значимо не изменялась при потреблении животными воды с добавками, тогда как в группе db/db потребление L-аргинина повышало ее как по сравнению с параметром у мышей этой группы, потреблявших воду без добавок, так и у контрольных животных, потреблявших L-аргинин. Потребление метформина животными с СД2Т понижало продукцию АФК относительно подгрупп «вода» и «L-аргинин».

Таким образом, значения кинетических параметров различались как между контрольными и db/db мышами, так и между подгруппами, преимущественно в группе с СД2Т: потребление L-аргинина приводило к повышению реактивности фагоцитов в крови, а метформин, напротив, ослаблял ее. В соответствии с рассчитанными коэффициентами корреляции Спирмена в группе db/db мышей в отличие от контрольной группы отсутствует корреляция между базовым уровнем генерации АФК и параметрами ответов на ОЗ (амплитуда, Тмакс), а также между Тмакс и продукцией АФК, что указывает на вовлечение разных механизмов активации фагоцитоз-зависимой генерации АФК в исследуемых группах. Регрессионные линии для пары «базовый уровень/амплитуда» при разных

концентрациях ОЗ для контрольной группы во всех подгруппах располагаются однотипно и почти совпадают, тогда как в группе животных с СД2Т такое расположение характерно только для подгруппы «метформин», т.е. потребление метформина нормализует соотношение базы и кинетических параметров ответа. Этот подход может быть использован для оценки эффективности терапии. Сведения по влиянию L-аргинина на фагоцитоз нейтрофилами различных бактерий противоречивы, но показано, что добавка L-аргинина улучшала закисление фагосом, увеличивала выработку АФК и повышала потребление оксида азота нейтрофилами в ответ на изолят *Klebsiella pneumoniae* KP35 [10]. По нашим данным в группе мышей с СД2Т также наблюдалось увеличение продукции АФК при фагоцитозе ОЗ у животных, потреблявших L-аргинин. Нормализация кинетических параметров ответов на ОЗ у db/db мышей, потреблявших метформин, может быть обусловлена его облегчающим действием на поглощение глюкозы периферическими тканями вследствие подавления активности фосфатазы SHIP2, негативного регулятора сигнального пути PI3K/Akt [11].

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №22-15-00215).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tikhonova IV, Dyukina AR, Grinevich AA, Shaykhutdinova ER, Safronova VG. Changed regulation of granulocyte NADPH oxidase activity in the mouse model of obesity-induced type 2 diabetes mellitus. Free Radic. Biol. Med. 2024;216:33-45.
2. Tikhonova IV, Grinevich AA, Guseva IE, Safronova VG. Modified kinetics of generation of reactive species in peripheral blood of patients with type 2 diabetes. Free Radic. Biol. Med. 2020;159:76-86.
3. Veerabathiran R, Aswathi P, Iyshwarya BK, Rajasekaran D, Akram Hussain RS. Genetic predisposition of LEPR (rs1137101) gene polymorphism related to type 2 diabetes mellitus – a meta-analysis. Ann. Med. 2023;55:2302520.
4. Cefalu WT. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. ILAR J. 2006;47:186-198.
5. Huang CK, Zhan L, Hannigan MO, Ai Y, Leto TL. P47(phox)-deficient NADPH oxidase defect in neutrophils of diabetic mouse strains, C57BL/6J-m db/db and db/+. J. Leukoc. Biol. 2000;67:210-215.
6. Liang CF, Liu JTC, Wang Y, Xu A, Vanhoutte PM. Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2013;33:777-784.
7. Bruder-Nascimento T, Callera GE, Montezano AC, He Y, Antunes TT, Cat AND, Tostes RC, Touyz RM. Vascular injury in diabetic db/db mice is ameliorated by atorvastatin: role of Rac1/2-sensitive Nox-dependent pathways. Clin. Sci. (London). 2015;128:411-423.

8. Clemmensen C, Smajilovic S, Smith EP, Woods SC, Bräuner-Osborne H, Seeley RJ, D'Alessio DA, Ryan KK. Oral L-arginine stimulates GLP-1 secretion to improve glucose tolerance in male mice. Endocrinology. 2013;154(11):3978-3983.
9. Zhu H, Jia Z, Li YR, Danelisen I. Molecular mechanisms of action of metformin: latest advances and therapeutic implications. Clin. Exp. Med. 2023;23:2941-2951.
10. Peñaloza HF, Ahn D, Schultz BM, Piña-Iturbe A, Gonza´ lez LA, Bueno SM. L-arginine enhances intracellular killing of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae ST258 by murine neutrophils. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020;10:571771.
11. Polianskyte-Prause Z, Tolvanen TA, Lindfors S, Dumont V, Van M, Wang H, Dash SN, Berg M, Naams JB, Hautala LC, Nisen H, Mirtti T, Groop PH, Wähälä K, Tienari J, Lehtonen S. Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHIP2 activity. FASEB J. 2019;33(2):2858-2869.

ПЕРИЦИТЫ ЯВЛЯЮТСЯ КЛЮЧЕВЫМИ ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫМИ ФАКТОРАМИ В СОСУДАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

Сюткина В.В., Антропова Ю.Г., Калинина Н.И., Ткачук В.А., Чечехин В.И.

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины медицинского научно-образовательного института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Артериальная гипертензия является растущей проблемой современной медицины. Артериальная гипертензия ежегодно ведет к все большему количеству смертей по всему миру [2]. Данное заболевание приводит к полиорганным повреждениям в организме человека. Одним из основных механизмов регуляции артериального давления является общее периферическое сопротивление сосудов (ОПСС). Также, большая часть лекарственных препаратов, направленных на лечение артериальной гипертензии, воздействует именно на уровень ОПСС, например, ингибиторы АПФ и блокаторы рецепторов ангиотензина. ОПСС регулируется посредством гормонов и нейромедиаторов, повышающих или снижающих тонус стенки сосудов - вазоконстрикторами и вазодилататорами соответственно. Считается, что большая часть рецепторов к вазоконстрикторам располагается на гладкомышечных клетках. Однако, в нашей лаборатории раннее было показано, что α1A-адренорецепторы, являющиеся вазоконстрикторными, располагаются на перицитах [1]. В связи с этим, мы предположили, что и другие рецепторы к вазоконстрикторам сконцентрированы преимущественно на перицитах, а не на ГМК и эндотелиальных клетках.

Методы. Данные секвенирования одиночных клеток подкожной жировой ткани человека были взяты из GEO и GSA и обработаны с помощью пакетов scanpy, harmony, scVI, Seurat, scDblFinder, SoupX, scib. Иммуногистохимическое окрашивание осуществляли на образцах подкожной жировой ткани здоровых доноров с использованием специфических антител к рецепторам и маркерам клеток, составляющих сосудистую стенку.

Результаты. На первом этапе нашей работы мы создали атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека. Для этого мы использовали доступные датасеты РНК секвенирования

одиночных клеток. В результате биоинформатического анализа датасетов мы создали атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани (Рис. 1).

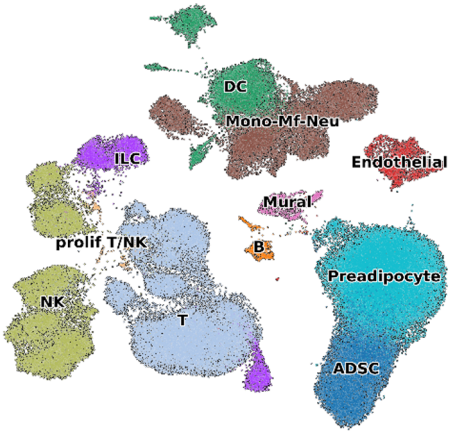


Рис. 1. Атлас клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека.

Далее были взяты отдельно клетки, составляющие стенку артериол, а именно, эндотелий артериол, перициты и гладкомышечные клетки. Маркеры этих клеток представлены на рисунке 2А. На рисунке 2Б представлена итоговая аннотация клеток сосудистой стенки.

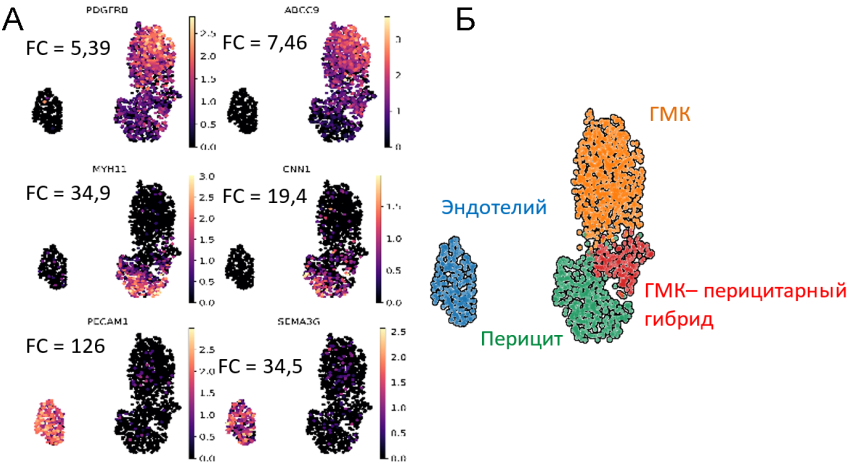


Рис. 2. А. Экспрессия генов маркеров перицитов (*PDGFRB*, *ABCC9*), ГМК (*MYH11*, *CNN1*) и эндотелия артериол (*PECAM1*, *SEMA3G*). FC – степень повышения экспрессии гена. Б. Аннотация клеток сосудистой стенки артериол жировой ткани.

Следующим шагом мы проанализировали экспрессию генов рецепторов вазоконстрикторов: ангиотензина II 1 типа – *AGTR1*, вазопрессина 1A типа – *AVPR1A*, эндотелина типа B – *EDNRB*. Мы выяснили, что они экспрессируются преимущественно на PDGFRβ-экспрессирующих перицитах, а не на CALP+ ГМК или CD31+ эндотелиальных клетках. (Рис. 3)

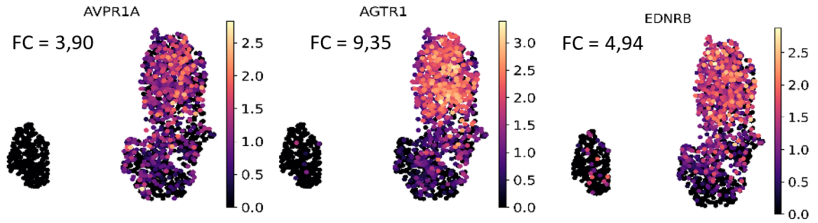


Рис. 3. Экспрессия основных рецепторов вазоконстрикторов (*AGTR1* - рецептор ангиотензина II 1 типа, *AVPR1A* – рецептор вазопрессина 1A типа, *EDNRB* – рецептор эндотелина типа B). FC – степень повышения экспрессии гена в кластере перицитов по сравнению со всеми остальными клетками.

Для подтверждения данных РНК секвенирования одиночных клеток мы использовали иммуногистохимическую окраску сосудов жировой ткани человека (Рис. 4).

Для того, чтобы показать распределение рецепторов к вазоконстриктору – вазопрессину, мы использовали двойное окрашивание на *AVPR1A*-рецептор вместе с маркером эндотелиальных (CD31), или гладкомышечных клеток (CALP+), или перицитов (PDGFRβ). На сегодняшний день считается, что регуляторы контрактильности сосудов располагаются на ГМК. Однако, согласно полученным нами данным, в сосудах жировой ткани *AVPR1A*-рецептор локализовался в основном на PDGFRβ-экспрессирующих перицитах сосудов и почти не экспрессировались на CALP+ ГМК. Также мы показали отсутствие *AVPR1A*-рецепторов на эндотелиальных CD31+ экспрессирующих клетках.

Используя двойное иммуногистохимическое окрашивание на *AGTR1*-рецептор вместе с маркером эндотелиальных (CD31), или гладкомышечных клеток (CALP+), или перицитов (PDGFRβ), мы также показали, что *AGTR1* - рецепторы к вазоконстриктору ангиотензину II располагаются как на ГМК, так и на PDGFRβ-экспрессирующих перицитах сосудов. В соответствии с полученными нами данными, в сосудах жировой ткани рецептор локализовался в основном на PDGFRβ-экспрессирующих перицитах сосудов и почти не экспрессировались на CALP+ ГМК. Для сравнения показали отсутствие данных рецепторов на CD31+ эндотелиальных клетках.

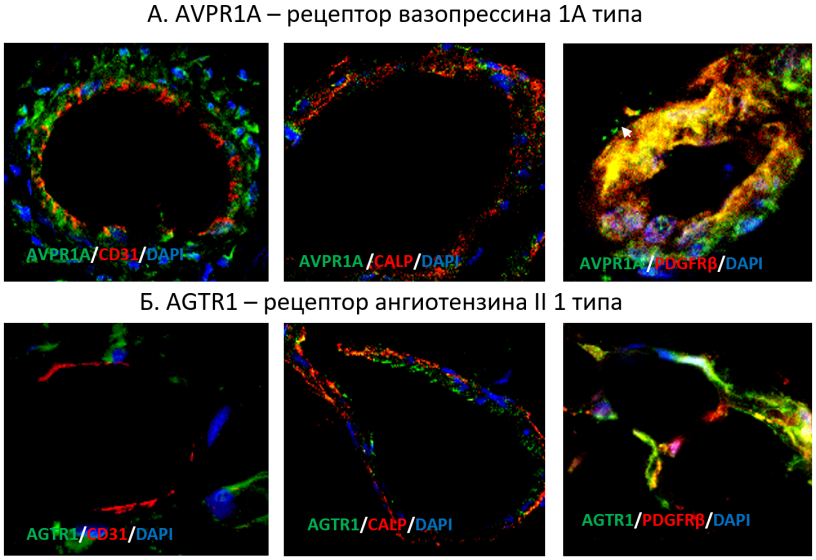


Рис. 4. Анализ экспрессии рецепторов вазоконстрикторов в сосудистых клетках жировой ткани человека. А. Анализ солокализации *AVPR1A*-рецепторов и CALP+ гладкомышечных клеток, PDGFRβ+ перицитов и CD31+ эндотелиальных клеток. Б. Анализ солокализации *AGTR1*-рецепторов и CALP+ гладкомышечных клеток, PDGFRβ+ перицитов и CD31+ эндотелиальных клеток. Ядра окрашены DAPI.

Таким образом, мы показали, что в сосудах жировой ткани человека рецепторы основных вазоконстрикторов, таких как ангиотензин II, вазопрессин и эндотелин, экспрессируются перицитами, а не гладкомышечными клетками. Эти данные указывают на ключевую роль перицитов в регуляции тонуса сосудов и артериального давления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chechekhin V., Ivanova, A., Kulebyakin, K. [и др.]. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. 2023. Т. 12, № 4. С. 585.
2. Zhou B., et al. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension // Nature Reviews Cardiology. 2021. Т. 18, № 11. С. 785–802.

МАГНИТОМЕХАНИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ НАНОДИСКАМИ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫМИ АПТАМЕРАМИ

Федотовская В.Д.[1,2], Кошманова А.А.[1,2], Лузан Н.А.[2], Коловская О.С.[1,2], Замай Т.Н.[1,2], Лукьяненко К.А.[1,2,3], Морозов Е.В.[1], Швед Н.А.[4,5], Мохов А.А.[1], Лапин И.Н.[6], Кичкайло А.С.[1,2], Замай С.С.[2]

[1]ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия
[2]ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия
[3]ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия
[4]ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия
[5]Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского, Владивосток, Россия
[6]ФГАОУ ВО «Томский государственный университет», Томск, Россия

Введение. Рак является одной из самых распространенных причин смертности в мире [1]. Текущие методы терапии, такие как хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия, обладают ограниченной эффективностью и часто сопровождаются серьезными побочными эффектами. Эта опасность особенно высока при лечении опухолей головного мозга, где полное хирургическое удаление опухоли практически невозможно из-за микроскопических размеров отдельных раковых клеток [2]. Остающиеся клетки могут стать источником роста опухоли и причиной рецидива заболевания. Необходимость в новых, более точных и безопасных методах лечения глиобластомы является крайне актуальной.

В данной работе рассматривается магнитомаханическая терапия с помощью «умного наноскальпеля» – магнитных нанодисков, функционализированных аптамерами. Под действием слабого переменного негреющего магнитного поля диски способны механически повреждать отдельные опухолевые клетки, приводя к их гибели. Эффективность такого метода уже была показана *in vitro* и *in vivo* на асцитной карциноме Эрлиха [3]. Данная технология открывает новые перспективы для более точного и эффективного лечения злокачественных новообразований. Предлагаемый подход с использованием магнитного наноскальпеля представляет собой многообещающий инструмент для адресной терапии глиобластомы. Он обладает рядом преимуществ. Благодаря аптамеру, наноскальпель направленно воздействует на клетки глиобластомы, минимизируя повреждение здоровых тканей, что позволяет

максимально сконцентрировать его действие в области поражения и избежать токсичности традиционных химиотерапевтических препаратов.

Материалы и методы. Для проверки эффективности магнитомеханической терапии глиобластомы были проведены исследования *in vitro*. Клеточную линию U87MG-IDH1het, несущую гетерозиготную мутацию R132H в гене IDH1, культивировали в среде DMEM с добавлением L-глутамина (Capricorn Scientific, GmbH, Ebsdorfergrund, Германия), а также 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточную линию поддерживали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2.

С целью визуализации и определения локализации нанодисков клетки глиобластомы культивировали на конфокальных чашках и инкубировали в течение 30 минут с нанодисками, ковалентно связанными с тиоловым аптамером, специфичным к глиобластоме. Для дифференциальной визуализации внутриклеточных структур, клетки предварительно окрашивали Hoechst 33342 (ядра, синий цвет) и DiBAC4(3) (мембранный потенциал, зеленый цвет), а нанодиски визуализировали с помощью TOTO-3 (интеркалирующий агент, встраивающийся в двуцепочечные участки ДНК-аптамера, красный цвет). Измерения проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Hamburg, Germany).

Для определения терапевтического эффекта магнитомеханической терапии *in vitro* использовали клетки глиобластомы, культивированные в конфокальных чашках. Для окрашивания клеток использовали DAPI (ядра, синий), DiBAC4(3) (мембранный потенциал, зеленый) и пропидиум йодид (интеркалирующий краситель, связывающийся в ДНК, красный). Пропидиум йодид использовали для оценки количества мертвых клеток. В чашки с клетками добавляли магнитные нанодиски, функционализированные аптамерами к глиобластоме. Затем чашки помещали в магнитное поле, создаваемое магнитной катушкой, на 5-10 секунд. Использовались следующие параметры поля: форма сигнала – синус, частота – 20 Гц, напряженность – 100 Э. Через 10 минут после терапии оценивали количество разрушенных клеток с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа NCF950 (Nexcope, Китай).

Для создания иммуносупрессии мышам пять раз с интервалом 48 часов вводили циклоспорин (20 мг/кг) и циклофосфамид (60 мг/кг) внутрибрюшинно, а также ежедневно кетоконазол (20 мг/кг) перорально. Затем проводили ортотопическую трансплантацию глиальных культур. Модель глиобластомы человека формировали путем интракраниального введения клеток глиобластомы, полученных от пациента. Рост опухоли контролировали ЯМР-томографией.

Противоопухолевую терапию проводили нанодисками Au/Ni/Au, функционализированными аптамером Gli-233. Оптимальные параметры магнитного поля для микрохирургии были определены ранее на клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* [3]. На основании проведенных экспериментов были выбраны оптимальные характеристики переменного магнитного поля, в которое помещались мыши: частота 20 Гц, напряженность 100 Э и синусоидальная форма поля.

Исследование проводилось в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Протокол был одобрен локальным комитетом по этике экспериментов на животных Красноярского государственного медицинского университета № 3 от 16 декабря 2022 года. Все операции выполнялись под анестезией, и были предприняты все усилия для минимизации страданий животных.

Результаты и обсуждение. Анализ изображений клеток глиобластомы, полученных с помощью конфокального микроскопа, показал, что нанодиски, функционализированные аптамером, специфичным к глиобластоме, преимущественно локализуются на поверхности клеток глиобластомы (рис. 1). При этом сигнал от красителя TOTO-3 (красный), визуализирующего нанодиски, в значительной степени совпадал с областью мембранного потенциала, окрашенной красителем DiBAC4(3) (зеленый). Это указывает на то, что нанодиски взаимодействуют с клеточной мембраной. Ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342 (синий), четко визуализировались и не демонстрировали перекрытия с сигналами от нанодисков.

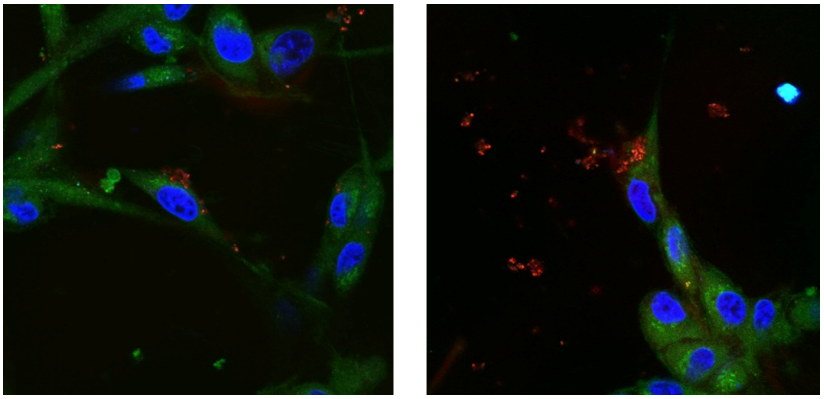


Рис. 1. Клетки глиобластомы, проинкубированные с нанодисками, функционализированными аптамером Gli-233. Зеленым показан мембранный потенциал клеток ($DiBAC_4(3)$), синим – ядро (Hoechst 33342), красным – аптамеры, связанные с нанодисками. Увеличение x100.

Конфокальная микроскопия выявила выраженный цитотоксический эффект магнитомеханической терапии, нацеленной на клетки глиобластомы с помощью нанодисков, модифицированных аптамерами. В экспериментальной группе наблюдалось значительное увеличение числа клеток, окрашенных пропидием йодидом (красный), что свидетельствовало о нарушении целостности клеточной мембраны и гибели клеток (рис. 2).

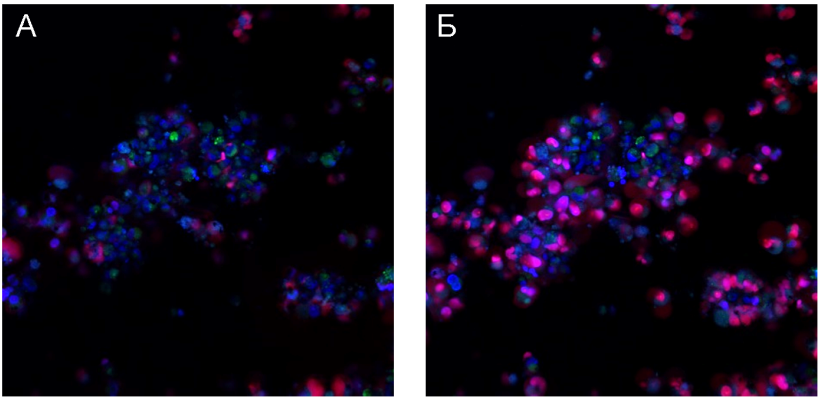


Рис. 2. Магнитомеханическая терапия нанодисками, функционализированными аптамером Gli-233. До терапии (А), через 10 минут после терапии (Б). Увеличение х20.

Результаты *in vivo* исследования продемонстрировали эффективность магнитомеханической терапии с использованием «умного» наноскальпеля для лечения глиальных опухолей. Через 14 дней после перевивки у животных отмечался значительный рост опухоли (рис. 3, А1 и Б1). Однако уже после двух сеансов магнитомеханической терапии наблюдалось выраженное уменьшение размеров глиальной опухоли (рис. 3, А1–А3), в то время как в контрольной группе, в которой животные получали нанодиски с неспецифическими праймерами, опухоли продолжали прогрессировать (рис. 3, В1–В3). Это свидетельствует о специфичности терапии с помощью нанодисков, модифицированных аптамерами к глиобластоме.

Разработка "умного" наноскальпеля для селективного уничтожения опухолевых клеток *in vivo* – важнейшая биомедицинская задача. Нанодиски с магнитными свойствами, функционализированные аптамерами, специфичными к опухолевым клеткам, могут выполнять функцию нанохирургических инструментов [4-6]. Магнитомеханическое разрушение клеток основано на воздействие нанодисков на белки клеточной мембраны или на проникновение их в клетку путем эндоцитоза

с последующей инкапсуляцией в лизосомы [7]. Предполагается, что разрыв лизосомальной мембраны под воздействием переменного магнитного поля вызывает гибель клетки [8,9]. Попадание дисков в клетку начинается с взаимодействия с белками клеточной мембраны, являющимися мишенями для аптамеров. Важной задачей является оптимизация количества нанодисков и параметров магнитного поля, а также решение проблемы удаления продуктов распада. Планируется применение данного метода для интраоперационного удаления отдельных опухолевых клеток, поскольку современные технологии позволяют производить диски в больших количествах.

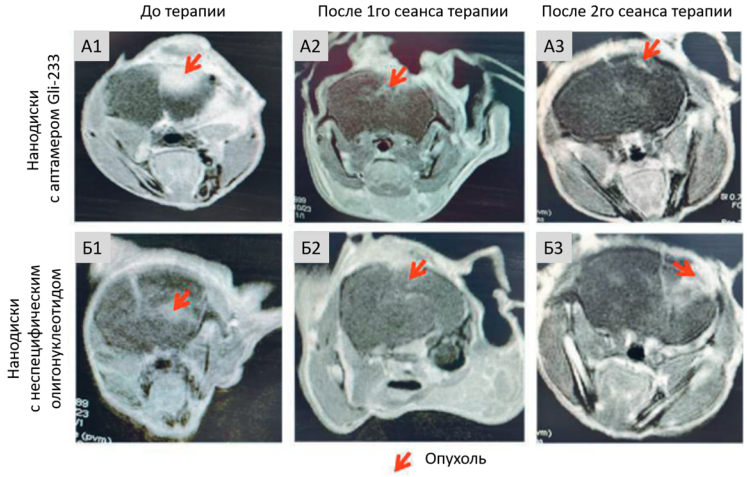


Рис. 3. ЯМР-томография головного мозга контрольных и опытных мышей до и после терапии.

Заключение. Проведенное исследование продемонстрировало перспективность использования магнитомеханической терапии с применением «умного» наноскальпеля – нанодисков, функционализированных аптамерами, для селективного уничтожения клеток глиобластомы *in vitro* и *in vivo*. Результаты показали, что нанодиски, модифицированные аптамерами к глиобластоме, эффективно связываются с опухолевыми клетками и под воздействием переменного магнитного поля индуцируют их гибель. Дальнейшие исследования, направленные на оптимизацию параметров магнитного поля, разработку биосовместимых нанодисков и совершенствование методов удаления продуктов распада, могут способствовать внедрению данной технологии в клиническую практику для лечения глиобластомы и других злокачественных новообразований.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности», Конкурса перспективных прикладных научных исследований по направлению лидерства «Сбережение здоровья граждан», реализуемых в рамках проектов по заказу юридических лиц (за исключением некоммерческих организаций), зарегистрированных на территории Красноярского края, выполняемых организациями, зарегистрированными на территории Красноярского края, осуществляющими научную, научно-техническую деятельность (далее – Конкурс) краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (ККФН) в целях реализации проекта «Научно-техническая поддержка создания на базе АО «НПП «Радиосвязь» пилотной производственной линии медицинского изделия «Умный наноскальпель» для микрохирургии глиобластомы», заявка № 20241022-08635 и при поддержке компании-партнера АО «НПП «Радиосвязь». Исследование эффективности магнитомеханической терапии *in vivo* методом ЯМР-томографии выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проекта № FWES-2022-0005.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R. L. et al. Cancer statistics, 2022 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2022. – Т. 72. – №. 1. – С. 7-33.
2. da Fonseca A. C. C. et al. Microglia in cancer: For good or for bad? //Glial Cells in Health and Disease of the CNS. – 2016. – С. 245-261.
3. Zamay T. et al. Magnetic nanoscalpel for the effective treatment of ascites tumors //Journal of Functional Biomaterials. – 2023. – Т. 14. – №. 4. – С. 179.
4. Fu Z., Xiang J. Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 8. – С. 2793.
5. de Franciscis V. Challenging cancer targets for aptamer delivery //Biochimie. – 2018. – Т. 145. – С. 45-52.
6. Duan T. et al. HPA aptamer functionalized paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles for enhanced anticancer therapy through targeted effects and microenvironment modulation //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – Т. 117. – С. 109121.
7. Goiriena-Goikoetxea M. et al. Disk-shaped magnetic particles for cancer therapy //Applied Physics Reviews. – 2020. – Т. 7. – №. 1.
8. Saftig P., Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function //Nature reviews Molecular cell biology. – 2009. – Т. 10. – №. 9. – С. 623-635.
9. Boya P., Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death //Oncogene. – 2008. – Т. 27. – №. 50. – С. 6434-6451.

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ И РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Фролова В.С.[1], Никишина Ю.О.[2], Никишин Д.А.[1,2]

[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Введение. Нейротрансмиттеры представляют собой группу биологически активных веществ, которые играют важную роль в передаче электрохимического импульса между нейронами, а также от нейронов к клеткам мышечной ткани и железистым клеткам. [1]. К данной группе относятся некоторые аминокислоты, 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), так и для высших многоклеточных животных, обладающих сложноустроенной нервной системой [3,4].

В середине прошлого столетия появились работы, демонстрирующие участие некоторых нейротрансмиттеров, в частности серотонина, в эмбриогенезе различных организмов [5-9]. Наличие компонентов серотонинергической системы на ранних стадиях развития, а также способность разнообразных фармакологических агентов оказывать влияние на процесс индивидуального развития позволили прийти к заключению, что серотонин влияет на рост и созревание яйцеклеток, селекцию фолликулов яичника, деления дробления, межбластомерные взаимодействия и другие процессы раннего эмбриогенеза [10-12]. Несмотря на обилие подобных исследований, представление о конкретной роли серотонина и компонентов его системы на процесс доимплантационного развития, а также последствия блокирования тех или иных компонентов различными веществами, все еще представляет интерес.

В рамках данной работы мы рассмотрели, каким образом на процесс доимплантационного развития мышей линии ICR влияют три фармакологических агента: флуоксетин, относящийся к группе селективных ингибиторов обратного захвата серотонина; резерпин – индольный алкалоид, блокирующий везикулярный транспортер моноаминов VMAT2; паргилин – вещество из группы блокаторов моноаминоксидазы. Для достижения данной цели мы оценили влияние исследуемых агентов на созревание ооцитов и доимплантационное развитие в условиях *in vitro*, а также определяли относительное

содержание серотонина по оценке иммунореактивности на соответствующих стадиях.

Материалы и методы. *Животные.* Работу проводили на половозрелых самках мышей линии ICR. Животных содержали в контролируемых условиях (температура 22–24 ◦C и фотопериод 14L:10D). Мышам предоставлялся свободный доступ к пище и воде.

Протокол суперовуляции и получения ооцитов и эмбрионов. Для протокола гормональной стимуляции использовались взрослые мыши в возрасте 2 месяцев. Подкожная инъекция гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (5 МЕ/мышь) производилась между 15:00 и 16:00. Через 46–48 часов после инъекции PMSG выполняли инъекцию хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, 5 МЕ/мышь). Яичники и яйцеводы отделяли через 20 часов после инъекции ХГЧ, промывали от крови dPBS и охлаждали до 4 °C. Яичники и яйцеводы помещали в свежую среду dPBS (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США), после чего GV-ооциты выделяли путем разрыва антральных фолликулов в яичниках иглой 29G, а зиготы выделяли путем разрезания ампулярной части яйцеводов. Полученные ооциты и зиготы, заключенные в ооцит-кумулюсные комплексы, собирали пипеткой-стриппером и переносили в четырехлуночный планшет (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США), содержащий среду dPBS. Затем к зиготам добавляли раствор гиалуронидазы (80 МЕ/мл) и инкубировали при 37 °C в течение одной минуты для удаления кумулюсных клеток, после чего их трижды промывали в dPBS.

Для получения зигот самок помещали вместе с самцами на ночь. Если утром обнаруживалась вагинальная пробка, время развития принималось за dpc 0,5.

Эффекты блокады везикулярного транспорта серотонина. Для определения уровня накопления серотонина при блокировке везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 одной из групп животных ежедневно сначала в течение 7 дней давали флуоксетин перорально (в концентрации 20 мг/кг веса), а в течение следующих 7 дней вводили резерпин в концентрации 1 мг/кг массы тела. Второй группе вводили диметилсульфоксид в аналогичной концентрации, так как резерпин нерастворим в физиологическом растворе.

В конце эксперимента из каждой группы извлекали один яичник и использовали для последующего анализа методом ВЭЖХ, в то время как второй яичник фиксировали для получения криосрезов для дальнейшего анализа методом иммуногистохимии. Чтобы определить влияние резерпина на созревание ооцитов, GV-ооциты собирали из яичников, а MII-ооциты собирали из яйцеводов и фиксировали для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Уровни серотонина в яичнике измеряли методом ВЭЖХ с электрохимическим обнаружением. Замороженные образцы гомогенизировали в 120 мкл 0,1 N перхлорной кислоты, содержащей 10 пкм/мл внутреннего стандарта гидробромида 3,4-дигидроксибензиламина. Затем образцы центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин при 4 °C.

Разделение ВЭЖХ проводили на обращенно-фазовой колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4,6 × 150 мм, диаметр пор 3 мкм (Dr. Majsch, Германия) при +30 °C и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом 1260 Infinity II (Agilent, США). Подвижная фаза состояла из 0,1 М цитратно-фосфатного буфера, 0,3 мМ октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (все реагенты от Sigma-Aldrich, США), pH 2,9. Электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Нидерланды) был оснащен стеклоуглеродным рабочим электродом (+0,85 В) и электродом сравнения Ag/AgCl. Пики серотонина и внутреннего стандарта определялись на основе времени удерживания в стандартном растворе.

Эффекты накопления серотонина. Для модуляции повышенного уровня накопления серотонина в доимплантационном развитии полученные зиготы помещали в инкубатор на 4 дня в одну из четырех сред: среда KSOM, среда KSOM с добавлением серотонина (концентрация 1 мкМ), среда KSOM с добавлением паргилина (концентрация 5 мкМ) или среда KSOM с добавлением серотонина (концентрация 1 мкМ) и паргилина (концентрация 5 мкМ). После достижения необходимой стадии эмбрионы фиксировали для дальнейшего иммуногистохимического анализа и анализа методом ПЦР в реальном времени.

Иммуноцитохимия. GV-ооциты, MII-ооциты и эмбрионы фиксировали в течение одного часа при комнатной температуре в 4% растворе параформальдегида, разведенном на PBS. Затем ооциты и эмбрионы обрабатывались 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 кроличьи антитела против серотонина (Sigma-Aldrich, S5545, 1:1000). Затем образцы отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа во вторичных FITC-конъюгированных козьих антителах 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 конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Германия). Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ.

Результаты. Количественный анализ, проведенный с использованием метода ВЭЖХ, выявил значительное снижение содержания серотонина в яичниках самок, получавших последовательно флуоксетин и резерпин, при этом значения достигали лишь 20% от контрольных уровней. Иммуноокрашивание серотонина в ткани яичников показало, что количество детектируемого серотонина в ооцитах растущих фолликулов гораздо меньше, чем в контрольных образцах.

Значительное снижение иммунореактивности серотонина наблюдалось также в незрелых GV-ооцитах, выделенных из яичников, и в зрелых MII-ооцитах, выделенных из яйцеводов мышей, получавших инъекции резерпина в течение одной недели. По сравнению с контрольной группой, получавшей инъекции ДМСО, в ооцитах после обработки резерпином наблюдалось значительное снижение содержания серотонина почти на 50% для GV-ооцитов и на 30% для MII-ооцитов. Важно отметить, что в большинстве случаев, помимо снижения общего содержания серотонина, его выраженная точечная локализация в кортикальной области ооцитов практически устраняется. Это позволяет предположить существование везикулярного компартмента внутри ооцита, где происходит накопление серотонина в результате активности VMAT2. Полученный результат подтверждает функциональную активность внутриклеточного везикулярного транспорта моноаминов на изученных стадиях.

В рамках данной работы мы также попытались смоделировать эффект чрезмерного накопления серотонина в клетках ранних эмбрионов *in vitro*. В качестве фармакологического агента мы использовали паргилин – вещество, которое блокирует моноаминоксидазу А, отвечающую за деградацию серотонина внутри клеток. Наш эксперимент показал, что гипернакопление серотонина происходит только при единовременной инкубации развивающихся зародышей в серотонине и паргилине. При этом при инкубации только в серотонине повышение накопленного серотонина не происходит, так как моноаминоксидаза продолжает активно утилизировать его из клеток; в случае инкубации исключительно в паргилине чрезмерного накопления также не наблюдается, в виду того, что серотонин в клетках развивающегося зародыша является продуктом экзогенным (поступает от матери), отсутствующим в *in vitro* среде. Этот результат свидетельствует о том, что в клетках эмбрионов функционирует захват серотонина из внешней среды и его внутриклеточная деградация.

Выводы. При пероральном приеме флуоксетина и последующим приемом резерпина содержание серотонина в яичниках снижается до 20% от нормы. При длительном приеме флуоксетина в случае наступления беременности внутриутробное развитие продолжается по крайней мере до стадии бластоцисты. Иммунореактивность серотонина в GV-ооцитах, полученных из яичников, и в единичных MII-ооцитах, полученных из яйцеводов, остается на минимальном уровне по сравнению с контрольными образцами. При единовременной инкубации в серотонине и паргилине развивающихся зигот до стадии бластоцисты происходит гипернакопление серотонина во всех типах клеток бластоцисты.

Эта работа проясняет и расширяет наше понимание функционирования серотонинергической системы в оогенезе и эмбриогенезе млекопитающих. Однако полный спектр возможных эффектов на репродуктивную функцию еще предстоит тщательно изучить. Для ответа на эти вопросы необходимо провести дополнительные фармакологические исследования, касающиеся блокировки работы различных рецепторов и других регуляторных компонентов, влияющих на работу переносчиков серотонина.

Финансирование. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-74-10009.

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; 1184 p.
2. Torres, G, Gainetdinov, R, Caron, M. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. Nat. Rev. Neurosci. 2003;4: 13–25.
3. Xing, L, Huttner, WB. Neurotransmitters as Modulators of Neural Progenitor Cell Proliferation During Mammalian Neocortex Development. Front. Cell Dev. Biol. 2020; 8:391.
4. Yamamoto, K, Vernier, P. The evolution of dopamine systems in chordates. Frontiers in neuroanatomy. 2011; 5:21.
5. Бузников, Г.А. Применение дериватов триптамина для изучения роли 5 окситриптамина (серотонина) в эмбриональном развитии беспозвоночных. Докл. АН СССР. 1963; 152(5): 1270.
6. Бузников, Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. Москва, Наука. 1967; 265 с.
7. Бузников, Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. Москва, Наука. 1987; 232 с.
8. Бузников, Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. Онтогенез. 2007; 38(4): 262-270.
9. Никитина Л.А., Трубникова О.Б., Бузников Г.А. Эффекты нейротрансмиттеров и их антагонистов на созревание ооцитов. Эффект антагонистов серотонина на

созревание in vitro ооцитов амфибий. Онтогенез. 1993; 24: 229 – 236.
10. Alyoshina, NM, Tkachenko, MD, Nikishina, YO, Nikishin DA. Serotonin Transporter Activity in Mouse Oocytes Is a Positive Indicator of Follicular Growth and Oocyte Maturity. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24(14): 11247.
11. Frolova, VS, Ivanova, AD, Konorova, MS, Shmukler, YB, Nikishin DA. Spatial Organization of the Components of the Serotonergic System in the Early Mouse Development. Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol. 2023; 17(S1): 59–S64.
12. Frolova, VS, Nikishina, YO, Shmukler, YB, Nikishin, DA. Serotonin Signaling in Mouse Preimplantation Development: Insights from Transcriptomic and Structural-Functional Analyses. Int. J. Mol. Sci. 2024; 25(23):12954.

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ЭКСПРЕССИЮ PDL-1 И CD73 МИЕЛОИДНЫМИ СУПРЕССОРНЫМИ КЛЕТКАМИ И ИХ ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ

Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Усанина Д.Ю., Бочкова М.С., Заморина С.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Введение. Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) представляют собой уникальную популяцию клеток врожденной иммунной системы, обладающую значительным регуляторным потенциалом [1]. Эти клетки делятся на две основные субпопуляции: гранулоцитарные (PMN-MDSC, G-MDSC), характеризующиеся экспрессией CD33low CD11b+ CD14- CD15+/CD66b+, и моноцитарные (M-MDSC), определяемые как CD33+ CD11b+ CD14+ HLA-DR- /low CD15- /CD66b-. MDSC способны подавлять иммунный ответ посредством различных механизмов в широком спектре патологических состояний, включая аутоиммунные расстройства, онкологические заболевания и сепсис, а также в непатологических условиях, таких как беременность [2,3]. Физиологически протекающая беременность характеризуется изменениями, направленными на создание динамической иммунной толерантности к полуаллогенному эмбриону. Среди факторов, способствующих этой толерантности, особую роль играют белки, ассоциированные с беременностью. Трофобластический beta1-гликопротеин (ТБГ; PSG) является основным фетоплацентарным белком, синтезируемым клетками цито- и синцитиотрофобласта, и обладает выраженными иммуносупрессивными свойствами.

Сложная структура и разнообразие форм ТБГ создают трудности при получении чистого нативного препарата. В научных исследованиях обычно используют рекомбинантные формы ТБГ, но они имеют недостатки: отличия в структуре, неполное сворачивание белка и неравномерные посттрансляционные модификации. Наш коллектив разработал запатентованную методику получения нативного человеческого ТБГ, благодаря чему было продемонстрировано его влияние на экспрессию IDO у антигенпрезентирующих клеток, активность регуляторных Т-лимфоцитов, Th17-клеток, Т-клеток памяти и цитокиновый профиль этих клеток. Ключевой аспект нашего исследования — установление роли ТБГ в регуляции дифференцировки и функций миелоидных супрессорных клеток (MDSC) периферической крови человека.

Ранее нашим коллективом было показано влияние ТБГ на дифференцировку MDSC с одновременной оценкой продукции ферментов IDO и Arg1, которые являются одним из самых распространенных показателей супрессивной функции MDSC. Тем не менее, важно установить влияние и на другие функциональные показатели MDSC для более полного понимания роли ТБГ в создании иммунной толерантности. Такими показателями служат фермент iNOS, мембранный рецептор PD-L1 (лиганд программируемой клеточной гибели) и поверхностная экто-5'-нуклеотидаза CD73.

Цель работы – изучить влияние нативного и рекомбинантного ТБГ на функциональную активность MDSC посредством измерения продукции ими фермента iNOS, экспрессии мембранных молекул PDL-1 и CD73 и цитокинового профиля культуры.

Материалы и методы.

Объекты. Периферическую кровь добровольных доноров (n=4) получали методом венепункции. Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации ВМА (2000 г.) и Протокола Совета Европы о правах человека в биомедицине (2005 г.). Экспериментальная схема была одобрена Комитетом по этике ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009, протокол №15 от 15.02.2022). Все участники предоставили письменное информированное согласие.

Методика. Мононуклеарные клетки (МПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности (ρ=1,077 г/см³, «Диаколл», Россия). CD11b+ клетки изолировали иммуномагнитной сепарацией (MacsiBeads, Miltenyi Biotec, Германия). Клетки (1×10^6) культивировали в RPMI-1640 с добавлением GM-CSF (20 нг/мл, Miltenyi Biotec) в течение 3 дней (5% CO_2, 37°C). Затем клетки активировали IL-1β (20 нг/мл) и ЛПС (0,1 мкг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 4 дней , добавляя нативный ТБГ (1, 10, 100 мкг/мл, патент РФ №2367449) или рекомбинантный ТБГ (1, 10 мкг/мл, Cusabio).

Анализ. Фенотип MDSC определяли методом проточной цитометрии (CytoFLEX S, Beckman Coulter) с использованием антител: HLA-DR-Alexa Fluor 750, CD33-APC, CD11b-Alexa Fluor 405, CD66b-PE, CD14-PerCP (R&D Systems), PD-L1-FITC (BioLegend, США). Мёртвые клетки исключали при помощи live/dead красителя Zombie Aqua (ZA; BioLegend, США), а лимфоциты/NK-клетки с помощью CD19/CD56/CD3-AF700. После гейтирования ZA-Lin-CD11b+CD33+ клеток определяли долю PD-L1+ и CD73+ клеток на отдельных гистограммах, используя последовательное гейтирование и FMO-контроль. Данные обрабатывали в программе CytExpert (Beckman Coulter, США).

Концентрацию iNOS в супернатантах CD11b+- культур измеряли ИФА-набором HEA837HU (Cloud-Clone, Китай). После культивирования MDSC с ТБГ (нативным и рекомбинантным) супернатанты замораживали для анализа цитокинов.

Цитокиновый профиль (17 маркеров: G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17A, MCP-1, MIP-1β, TNF-α) определяли на MAGPIX (BioRad, США) с использованием 17-plex панели Bio-Plex Pro (Merck, Германия). Отмывки планшетов выполняли ручным магнитным промывателем.

Результаты и обсуждение.

Влияние нативного и рекомбинантного ТБГ на PD-L1 в MDSC. Рекомбинантный ТБГ в концентрации 1 мкг/мл достоверно повышал уровень поверхностного PD-L1 на CD11b+-производных MDSC (рис. 1). При этом в концентрации 10 мкг/мл наблюдалась тенденция к снижению доли PD-L1+ - клеток. PD-L1, взаимодействуя с рецептором PD-1 на Т-лимфоцитах, подавляет их активность, усиливая иммуносупрессию [4]. Результаты предполагают, что ТБГ-индуцированное повышение PD-L1 на MDSC усиливает их роль в регуляции Т-клеточного ответа. Полученные данные согласуются с ранее выявленной способностью ТБГ повышать экспрессию IDO — другого ключевого фермента супрессии, что подтверждает его роль в модуляции иммуносупрессивного потенциала MDSC [5].

Результаты подчеркивают важность концентрации и структурных особенностей ТБГ (нативная и рекомбинантная формы) в регуляции иммунного ответа.

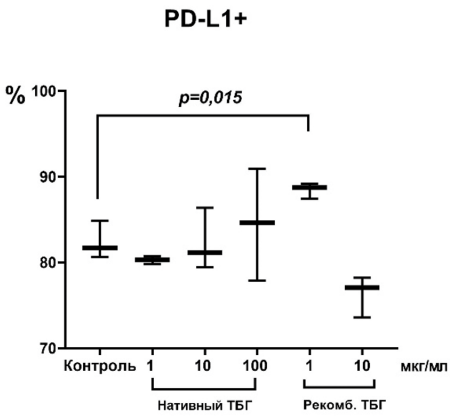


Рис. 1. Процент PD-L1+ клеток в гейте MDSC в культурах с добавлением ТБГ; n=4. Ось x – вид и концентрация ТБГ; ось y – процент PD-L1+ клеток в гейте MDSC. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники), максимумы и минимумы («усы») процентов от общего гейта MDSC.

Влияние нативного и рекомбинантного ТБГ на экспрессию CD73 клетками MDSC CD11b+-происхождения. Рекомбинантный ТБГ в концентрации 10 мкг/мл достоверно увеличивал уровень CD73 на MDSC, дифференцированных из CD11b+ клеток, тогда как при 1 мкг/мл наблюдалась тенденция к росту экспрессии (рис. 2). Нативный ТБГ не проявлял значимого влияния.

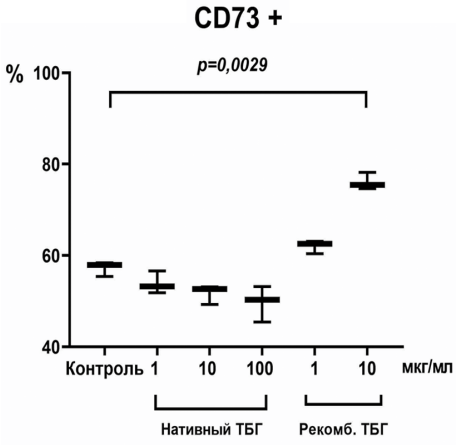


Рис. 2. Процент CD73+ клеток в гейте MDSC в культурах с добавлением ТБГ, n=4. Ось x – вид и концентрация ТБГ; ось y – процент CD73+ клеток в гейте MDSC. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники), максимумы и минимумы («усы») процентов от общего гейта MDSC.

CD73-зависимая супрессия реализуется через ингибирование пролиферации Т-клеток и стимуляцию Treg-ответа, усиливая иммунную толерантность [6]. Повышение CD73 в MDSC коррелирует с прогрессированием опухоли, что подчёркивает потенциал ТБГ как модулятора аденозинового сигналинга [7]. Стимуляция CD73 рекомбинантным ТБГ указывает на его роль в усилении иммуносупрессивного фенотипа MDSC. Отсутствие эффекта нативного ТБГ может быть связано с различиями в посттрансляционных модификациях, влияющих на связывание с клеточными рецепторами. Полученные данные согласуются с ранее выявленной способностью ТБГ модулировать IDO и PD-L1, подтверждая его многокомпонентное действие на иммунорегуляторные пути. Таргетинг CD73 в комбинации с ТБГ-опосредованными подходами может стать стратегией коррекции иммуносупрессии при аутоиммунных патологиях и аллотрансплантации.

Активация CD73 в MDSC, как показано, зависит от TGF-beta — ключевого регулятора иммуносупрессивного микроокружения, который запускает сигнальные пути mTOR/HIF-1α. [8] Учитывая, что ТБГ действует через высвобождение латентной формы TGF-beta, повышение экспрессии CD73 на MDSC, вероятно, связано с увеличением концентрации TGF-beta в культурах.

Влияние нативного и рекомбинантного ТБГ на продукцию индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в культурах MDSC. iNOS, экспрессируемая Т-клетками, макрофагами и дендритными клетками, модулирует функции иммунных клеток через нитрование ключевых сигнальных молекул и индукцию апоптоза Т-лимфоцитов посредством генерации активных форм азота (например, пероксинитрита). Кроме того, NO, продуцируемый iNOS в MDSC, подавляет презентацию антигена дендритными клетками, что обратимо при блокировании iNOS.

В ходе исследования не выявлено статистически значимого влияния нативного или рекомбинантного ТБГ на уровень iNOS в супернатантах MDSC (рис. 3). Однако отмечена тенденция к повышению концентрации фермента в CD11b+-культурах при добавлении нативного ТБГ (1 мкг/мл) и рекомбинантного ТБГ (10 мкг/мл).

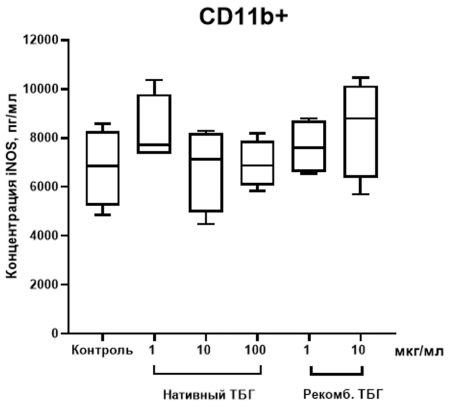


Рис. 3. Содержание iNOS в супернатантах культур, CD11b+ клеток, направленных в фенотип MDSC; n=4; ось x – вид и концентрация ТБГ; ось y – концентрация iNOS. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники), максимумы и минимумы («усы»).

Влияние нативного и рекомбинантного ТБГ на цитокиновый профиль MDSC. Мультиплексный анализ показал, что ни рекомбинантный, ни нативный ТБГ в схеме генерации MDSC из CD11b+-клеток ни в одной из использованных концентраций не влияли на

продукцию следующих цитокинов в культуре клеток: G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4 ,IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, MCP-1 (MCAF), TNF-α.

Рекомбинантный ТБГ (10 мкг/мл) достоверно снижал уровень хемокина MIP-1β (Рис.4, p=0,0319), участвующего в хемотаксисе CD4+ Т-лимфоцитов, моноцитов, дендритных и NKT-клеток.

Способность рекомбинантного ТБГ ингибировать MIP-1β, вероятно, обусловлена его структурными особенностями, включая трансляционную модификацию (гликозилирование) и конформационную специфичность, которые влияют на эффективность взаимодействия с клеточными рецепторами.

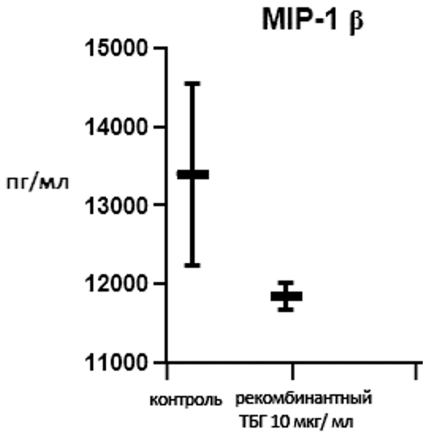


Рис. 4. Концентрация цитокина MIP-1β в супернатантах культур после недельного культивирования MDSC с рекомбинантным ТБГ по сравнению с контролем (без добавления ТБГ, но с добавлением факторов дифференцировки).
Примечание: * – достоверные ($p < 0,05$) различия медианных значений ($n = 4$) по сравнению с контролем белков с использованием непараметрического критерия Фридмана; представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения.

Заключение. Впервые оценено влияние нативного и рекомбинантного трофобластического бета1-гликопротеина (ТБГ) на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток (MDSC), ответственных за формирование иммунной толерантности, в том числе при беременности. Рекомбинантный ТБГ демонстрирует дозозависимые эффекты: при концентрации 1 мкг/мл повышает экспрессию PD-L1 на MDSC CD11b+-происхождения, а в

концентрации 10 мкг/мл увеличивает уровень CD73 и снижает продукцию MIP-1β. Оба маркера (PD-L1 и CD73) напрямую участвуют в активации супрессивных функций MDSC. Не выявлено эффектов ТБГ на продукцию индуцибельной NO-синтазы.

Результаты подчеркивают роль рекомбинантного ТБГ в усилении иммунорегуляторного потенциала MDSC, что важно для понимания механизмов толерантности при беременности. Структурные особенности рекомбинантного ТБГ (например, посттрансляционные модификации) могут определять его селективное действие, открывая перспективы для разработки биофармакологических препаратов при аутоиммунных патологиях и аллотрансплантации.

Статья написана в рамках НИОКТР «Изучение механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их оценки в норме и патологии», Рег. номер: 124020500027-7 («ИЭГМ УрО РАН»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gabrilovich D.I. Myeloid-Derived Suppressor Cells. Cancer Immunol Res. 2017;5(1):3–8.
2. Köstlin N., Hofstädter K., Ostermeir A.L., Spring B., Leiber A., Haen S., Abele H., Bauer P., Pollheimer J., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. J Immunol. 2016;196(3):1132–1145.
3. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Figley C., Long R., Park D., Carter D., Clements V.K. Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. J Leukoc Biol. 2017;101(5):1091–1101.
4. Noman M.Z., Desantis G., Janji B., Hasmim M., Karray S., Dessen P., Bronte V., Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med. 2014;211(5):781–790.
5. Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Гутина Е.В. Влияние трофобластического β1-гликопротеина на экспрессию аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками. Рос Иммунол Ж. 2023;26(3):403–408.
6. Ohta A., Gorelik E., Prasad S.J. et al. A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(35):13132–13137.
7. Allard B., Longhi M.S., Robson S.C., Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. Immunol Rev. 2017;276(1):121–144.
8. Hao Z., Li R., Wang Y. et al. Landscape of Myeloid-derived Suppressor Cell in Tumor Immunotherapy. Biomark Res. 2021;9:77.

Новые подходы и методы клеточных исследований

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

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

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

Метаболический синдром (МетС) представляет собой одну из важнейших медико-социальных проблем в мире, которая часто сопровождается ожирением и тесно связана с дисфункцией жировой ткани [1]. Жировая ткань – гетерогенный орган мезодермального происхождения, состоящий из зрелых адипоцитов и поддерживающих их клеток стромально-васкулярной фракции (СФВ) [2]. В литературе также описаны различия в функциональных особенностях и клеточном составе отдельных депо жировой ткани [3]. При ожирении дисфункция жировой ткани приводит к перераспределению последней, а также индуцирует изменения в её клеточном составе [4,5]. Таким образом, глубокое понимание функциональной гетерогенности жировой ткани является важным условием для разработки эффективных терапевтических подходов для лечения МетС и сопутствующих патологий.

Ожирение сопровождается экспансией ЖТ вследствие гиперплазии адипоцитов (формировании новых клеток), или их гипертрофии (увеличении клеток в размерах) [6]. Баланс между механизмами считается ключевым для поддержания метаболического здоровья ЖТ. Исторически изучение гетерогенности клеточного состава жировой ткани преимущественно проводилось методом клонального анализа [7]. Однако такой подход селективен в отношении пролиферирующих популяций, что не позволяет в полной мере оценить различия внутри ткани. Распространение методов транскриптомики на уровне одиночных клеток, таких как РНК секвенирование на уровне одиночных клеток (scRNA-seq) и ядер (snRNA-seq), существенно расширило возможности для более глубокого исследования гетерогенности жировой ткани.

Основной функциональной единицей жировой ткани является адипоцит. Для описания функциональной гетерогенности данных клеток необходимо применять методы работы с единичными клетками. Выделение в культуру и характеризация клеток на срезах представляет сложную задачу из-за жировой капли, не позволяющей клеткам адгезировать к пластику и разрушающейся при попытках приготовления гистологических срезов. Эти факторы в сочетании с крупным размером адипоцитов осложняют применение метода scRNA-seq [7]. Метод snRNA-seq, основанный на использовании ядер как источника транскриптома,

позволил компенсировать эту проблему; на данный момент опубликовано большое количество работ, посвящённых изучению гетерогенности адипоцитов с использованием метода snRNA-seq. Важно, однако, учитывать, что для наиболее полного охвата клеточных подтипов жировой ткани следует применять оба метода. В частности, было показано, что метод snRNA-seq с наиболее высоким разрешением выявляет адипоциты, в то время как метод scRNA-seq с большим разрешением выявляет клетки СВФ [8].

В современной литературе описано несколько функциональных подтипов адипоцитов. Например, в подкожной жировой ткани человека были выявлен подтип, характеризующийся высокой чувствительностью к инсулину [9]. Данный подтип характеризуется генами, кодирующими белки метаболизма глюкозы, такими как *TRARG1*, *GPD1*, *PFKFB3* и *MLXIPL*, а также метаболизма липидов, такими как *LIPE*, *DGAT2*, *PNPLA2*, *AGPAT2*, *GPAM* и *FASN*. Кроме того, в таких адипоцитах экспрессируется адипонектин *ADIPOQ*, а отличительными маркерами выступают перилипины *PLIN1* и *PLIN4*. Подтип составляет 14% от всех клеток жировой ткани у пациентов с нормальным весом, а при ожирении наблюдалось уменьшение его пропорции. В другой работе описано семь подтипов адипоцитов подкожного и висцерального депо жировой ткани, hAd1-7 [10]. Подтипы hAd1, hAd3, hAd4 и hAd7 локализованы преимущественно в подкожной ЖТ, подтипы hAd2 и hAd6 характерны для висцерального жира, а подтип hAd5 представлен в обоих депо. Подтипы hAd1 и hAd2 составляли 40% и 60% от всех адипоцитов и были выделены как «базальные». Подтип hAd3 связан с биосинтезом триглицеридов, специфично экспрессирующий *DGAT2*, *SREBF1* и *PNPLA3*. Для подтипа также специфичны *ADIPOQ* и адипсин *CFD*. Подтип hAd4 был обозначен по высокой экспрессии десатураз жирных кислот, таких как *ELOVL5* и *FADS3*. Подтип hAd5 главным образом связан с генами-маркерами инсулиновой сигнализации (в частности, *INSR*, *IRS1* и *IRS2*), а также с генами, кодирующими участников сфинголипидной сигнализации, таких как *ACER2*, *FYN* и *SPTLC3*. Подтип hAd6 связан с маркерами термогенеза, в частности *EBF2*, *ESRRG* и *PPARGC1A*. Подтип hAd7 не был явно охарактеризован авторами; однако, в последующих источниках упоминается специфическая экспрессия генов, кодирующих белки-участники Ca^{2+} сигнализации [11]. Из них, подтипы hAd4 и hAd7 более выраженно представлены при индексе массы тела >40 кг/м^2, а подтипы hAd5 и hAd6 более характерны для индекса массы тела <30 кг/м^2. Кроме того, упоминается и о субпопуляции так называемых «неклассических адипоцитов» [12], обогащенных маркерами процессов, связанных с иммунным ответом, фиброзом, ангиогенезом, а также рибосомальными и митохондриальным процессами.

Среди клеток СВФ особое место занимает пул резидентных стволовых клеток [13], обеспечивающих обновление жировой ткани на протяжении всей жизни, которые в культуре *in vitro* характеризуются как мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). МСК определяются как негематопоэтические мультипотентные постнатальные стволовые клетки, способные к дифференцировке в адипоциты, хондробласты и остеобласты [14]. Изучая функциональную гетерогенность МСК мы выявили с использованием метода scRNA-seq подтипы МСК жировой ткани с различным профилем ответа на катехоламины [15]. Мы установили, что МСК жировой ткани пациентов с ожирением экспрессирует преимущественно α1A изоформу адренорецепторов, экспрессия которой повышается при повышенной симпатической стимуляции клеток (симпатическом овердрайве). Данный процесс опосредуется β3-изоформой адренорецепторов. Кроме того, изучая функциональную гетерогенность МСК жировой ткани в отношении цАМФ-зависимой сигнализации, мы обнаружили при помощи scRNA-seq, что в более чем 50% всех клеток популяции МСК жировой ткани не экспрессируется мРНК ни одной изоформы аденилатциклазы (*ADCY1-10*) [16]. Это приводит к невозможности прохождения в данных клетках цАМФ/PKA-зависимой сигнализации и, соответственно, к отсутствию чувствительности в этих клетках к цАФМ-ассоциированным гормонам. Последующий анализ ответов на гормональную стимуляцию с использованием биосенсора PKA-Spark показал пропорции отвечающих клеток на различные гормональные стимулы, не превышающие 40%, что подтвердило на функциональном уровне наблюдения, сделанные при помощи scRNA-seq. В частности, только 37% и 34,7% от всей популяции МСК отвечало на аденозин и норадреналин, соответственно. Кроме этого, на основе оценки Ca^{2+} сигнализации в единичных клетках мы выявили, что 5,2±2,7% МСК жировой ткани с устойчивой экспрессией рецептора ангиотензина 1 типа отвечали на серийное добавление ангиотензина II [17]. Такие клетки отличались более высокой предрасположенностью к адипогенной дифференцировке за счёт ко-экспрессии рецептора ангиотензина II типа [18].

Таким образом, комплексное изучение гетерогенности клеточного состава тканей методами транскриптомного анализа и классических методов биологических исследований представляет собой мощный инструмент для выявления функциональных подтипов клеток. В контексте изучения жировой ткани открытыми остаются функциональная характеризация тех подтипов, выявленных только по экспрессии генов-маркеров, а также вопросы механизма формирования функциональных подтипов адипоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-75-30007 (https://rscf.ru/project/19-75-30007/).

ЛИТЕРАТУРА

1. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome // Curr Hypertens Rep. 2018. Vol. 20, N 2. – P. 12.
2. Eto H, Suga H, Matsumoto D, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue // Plast Reconstr Surg. 2009. Vol. 124, N 4. – P. 1087-1097.
3. Lynes MD, Tseng YH. Deciphering adipose tissue heterogeneity // Ann N Y Acad Sci. 2018. Vol. 1411, N 1. – P. 5-20.
4. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications // Mol Aspects Med. 2013. Vol. 34, N 1. – P. 1-11.
5. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging // Biochem Pharmacol. 2021. Vol. 192. – P. 114723.
6. Harvey I, Boudreau A, Stephens JM. Adipose tissue in health and disease // Open Biol. 2020. Vol. 10, N 12. – P. 200291.
7. Deutsch A, Feng D, Pessin JE, Shinoda K. The Impact of Single-Cell Genomics on Adipose Tissue Research // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, N 13. – P. 4773.
8. Whytock KL, Sun Y, Divoux A, et al. Single cell full-length transcriptome of human subcutaneous adipose tissue reveals unique and heterogeneous cell populations // iScience. 2022. Vol. 25, N 8. – P. 104772.
9. Bäckdahl J, Franzén L, Massier L, et al. Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin // Cell Metab. 2021. Vol. 33, N 9. – P. 1869-1882.e6.
10. Emont MP, Jacobs C, Essene AL, et al. A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue // Nature. 2022. Vol. 603, N 7903. – P. 926-933.
11. Maniyadath B, Zhang Q, Gupta RK, Mandrup S. Adipose tissue at single-cell resolution // Cell Metab. 2023. Vol. 35, N 3. – P. 386-413.
12. Lazarescu O, Ziv-Agam M, Haim Y, et al. Human subcutaneous and visceral adipocyte atlases uncover classical and nonclassical adipocytes and depot-specific patterns // Nat Genet. 2025. Vol. 57, N 2. – P. 413-426.
13. Si Z, Wang X, Sun C, et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies // Biomed Pharmacother. 2019. Vol. 114. – P. 108765.
14. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А. и др. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta naturae (русскоязычная версия). – 2011. – Т. 3, – №4. – С. 32-39.
15. Chechekhin V, Ivanova A, Kulebyakin K, et al. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. 2023. Vol. 12, N 4. – P. 585.
16. Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, et al. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, N 12. – P. 4442.
17. Sysoeva VY, Ageeva LV, Tyurin-Kuzmin PA, et al. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem Cell Res. 2017. Vol. 25. – P.115-122.
18. Tyurin-Kuzmin PA, Kalinina NI, Kulebyakin KY, Balatskiy AV, Sysoeva VY, Tkachuk VA. Angiotensin receptor subtypes regulate adipose tissue renewal and remodelling // FEBS J. 2020. Vol. 287, N 6. – P.1076-1087.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ ТРОМБОЦИТОВ

Герда Б.А., Волкова А.А., Андреева А.Ю., Добрылко И.А., Гамбарян С.П., Миндукшев И.В.

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

Введение. Тромбоциты способны динамически менять свой фенотип в ходе процессов гемостаза, воспаления, развития патологических состояний, таких как тромбоз, сепсис и онкологические заболевания [1-3]. Несмотря на растущее число идентифицированных субпопуляций тромбоцитов (например, «прокоагулянтные», «истощенные» и другие) [1], отсутствуют *in silico* модели, направленные на характеристику их фенотипического разнообразия. Существующие модели гемостаза описывают общую динамику адгезии, образования тромба, коагуляции, а также внутриклеточные сигнальные каскады [4,5]. В то же время, математическое моделирование успешно применяется при характеристике фенотипической пластичности опухолевых клеток и Т-лимфоцитов [6,7]. Мы охарактеризовали кинетику ряда трансформаций тромбоцитов в рамках агрегационного каскада, определили константы скоростей и параметры дозозависимости. На основе этих данных была разработана модель, описывающая динамику обратимых фенотипических переходов тромбоцитов в ответ на активацию агонистом и ингибирование по пути cAMP/PKA.

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (протокол № 03-02 от 28 февраля 2024 г.). Перед проведением венепункции у всех участников было получено информированное письменное согласие. Венозную кровь собирали в пробирки с цитратом натрия (0.106 моль/л, 3.2%) и 2 мМ ЭДТА. Обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) получали центрифугированием при 300×g (8 мин, комнатная температура). Аденозиндифосфат (ADP) и илопрост (Ilo) применяли в качестве активатора и ингибитора соответственно. Активацию интегринов контролировали методом проточной цитометрии (связывание PAC-1). Количественную оценку параметров реакций гемостаза проводили с использованием лазерной дифракции [8,9]. Изменение формы тромбоцитов оценивали по скорости реакции, рассчитанной на 5 секунде от начала процесса в LSI(12) (Vsh). Агрегацию анализировали в LSI(1) по площади под кривой за 120 секунд (AUCagg) или скорости, определенной

на 20-й секунде (Vagg). Данные представлены в виде mean ± sd. Решение системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ODE) выполняли методом LSODA. Оптимизацию параметров проводили с использованием алгоритмов basin-hopping (BH) и L-BFGS. Функция потерь – SSE. Точность предсказаний модели оценивали по коэффициенту детерминации (R^2).

Результаты.

Схема тромбоцитарного гемостаза. Мы выделили шесть основных фенотипов тромбоцитов и описали их взаимопревращения в кинетической модели (Рис. 1). Покоящиеся тромбоциты (rest) – неактивированные клетки в исходном состоянии. Сферизованные тромбоциты (sph) – ранняя стадия активации, характеризующееся изменением формы клеток (shape change). Тромботические (gp) – тромбоциты с активированными интегринами αIIbβ3. Агрегирующие тромбоциты (agg) – участвуют в образовании межклеточных агрегатов через фибриноген. Ингибированные тромбоциты (inh) – находятся в функционально подавленном состоянии вследствие активации сигнальных путей cAMP/cGMP. Истощённые тромбоциты (exh) – приобретают временную невосприимчивость к дальнейшей активации, что соответствует состоянию десенситизации или метаболического истощения.

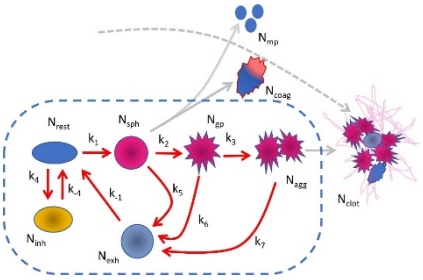


Рис. 1. Кинетическая схема тромбоцитарного гемостаза. Включает фенотипы: "rest" — покоящиеся, "inh" — ингибированные, "sph" — сферизованные, "gp" — с активированными αIIbβ3, "agg" — агрегированные, "exh" — истощенные. Переходы описываются константами k_{-1}, k_{-4}, k_1–k_7. Рассматриваемое звено гемостаза выделено синим, реакции трансформаций обозначены красными стрелками.

Метаматематическая основа модели. Динамика фенотипического распределения тромбоцитов описывалась системой шести ODE. Уравнение (1).

$$\begin{cases} dN_{rest}/dt = k_{-4}N_{inh} + k_{-1}N_{exh} - k_4N_{rest} - k_1N_{rest} \\ dN_{sph}/dt = k_1N_{rest} - k_2N_{sph} - k_5N_{sph} \\ dN_{gp}/dt = k_2N_{sph} - k_3{N_{gp}}^2 - k_6N_{gp} \\ dN_{agg}/dt = k_3{N_{gp}}^2 - k_7N_{agg} \\ dN_{exh}/dt = k_5N_{sph} + k_6N_{gp} + k_7N_{agg} - k_{-1}N_{exh} \\ dN_{inh}/dt = k_4N_{rest} - k_{-4}N_{inh} \end{cases}, \quad (1)$$

где N_x – процент фенотипа от общего числа клеток, %.

Мгновенные значения констант скоростей определяли по различным формам уравнения Хилла, которое в базовом виде имеет следующий вид. Уравнение (2).

$$k = k_{max}\frac{[A]^h}{EC_{50}^h + [A]^h}, \quad (2)$$

где k_{max} – максимальное значение константы скорости, 1/s; [A] – концентрация агониста, нМ; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация агониста, нМ; h – коэффициент Хилла (наклона кривой).

Для неконкурентного ингибирования прямых/обратных реакций Уравнение (2) принимает следующую форму. Уравнение (3).

$$k = k_{\max}\frac{[A]^{h_A}/\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}{[A]^{h_A} + EC_{50}^{h_A}}, \quad (3)$$

где k_i – константа ингибирования (для неконкурентного механизма равна полумаксимальной эффективной концентрации ингибитора IC_{50}), нМ; h_A – коэффициент Хилла для агониста (наклона кривой).

Всего при моделировании использовали 49 уравнений, интегрирующих сложные взаимодействия активирующих и ингибирующих стимулов, действующих через различные молекулярные механизмы.

Результаты моделирования. Результаты моделирования (Рис. 2) представлены для неконкурентной модели с использованием как экспериментально определенных, так и оптимизированных значений максимальных констант скоростей и параметров дозозависимостей. Практически все полученные кривые воспроизводят наблюдаемые в эксперименте закономерности; однако, на данном этапе нам не удалось воссоздать выраженное снижение дезагрегации при увеличении времени добавления илопроста после активации тромбоцитов.

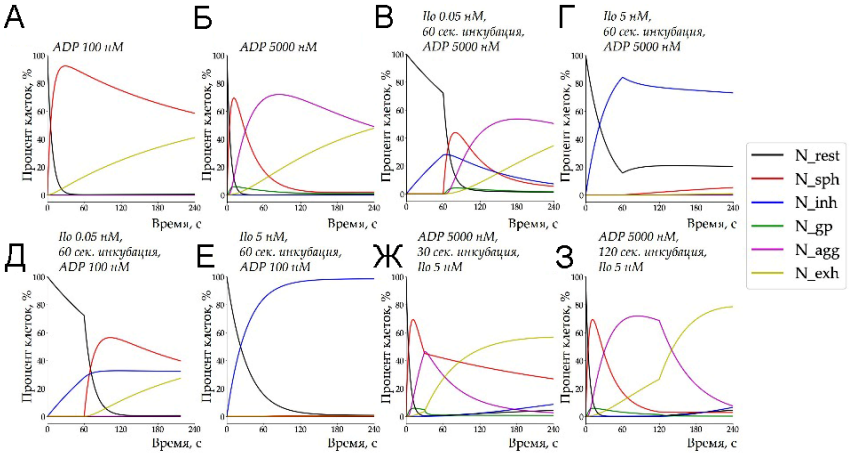


Рис. 2. Результаты моделирования для неконкурентной модели. (А) Низкая доза ADP → быстрая смена формы → истощение. (Б) Высокая доза ADP → смена формы + агрегация → медленная дезагрегация (истощение). (В) Низкая доза Ilo + высокая доза ADP → слабое ингибирование, незначительная агрегация. (Г) Высокая доза Ilo + высокая доза ADP → полное подавление агрегации (частичная смена формы сохраняется). (Д) Низкая доза Ilo + низкая доза ADP → более слабая смена формы по сравнению с отсутствием илопроста. (Е) Высокая доза Ilo + низкая доза ADP → полное подавление всех реакций. (Ж) Добавление Ilo через 30 сек. → почти полная дезагрегация. (З) Добавление Ilo через 120 сек. → сохраняется сильная дезагрегация.

Подбор параметров модели. В рамках перехода от покоящихся тромбоцитов к сферизованным и тромботическим все параметры (k_{max}, EC_{50}, IC_{50}, h) определены экспериментально. Мы также установили, что в наших условиях скорость реакции k_3 лимитирована скоростью k_2.

Экспериментально процесс перехода ингибированных тромбоцитов в покоящиеся не измерен из-за наложения сигналов и невозможности удаления ингибитора. В первом приближении в модели использовались параметры k_4, EC_{50} и h, полученные в экспериментах по ингибированию агрегации и изменения формы. Однако, моделируемое ингибирование оказалось ниже экспериментального. Добавление константы ингибирования (k_i) улучшило соответствие, показав, что наилучшая модель основана на неконкурентном механизме (Рис. 3). Все параметры обратимого ингибирования покоящихся клеток оптимизированы методами BH и L-BFGS для всех исследованных механизмов.

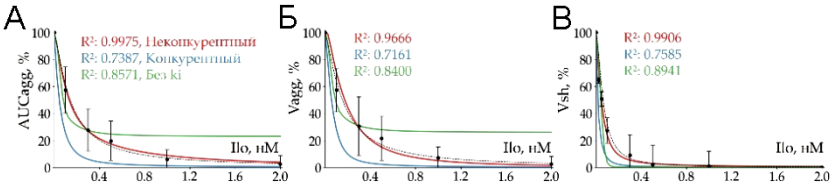


Рис. 3. Механизмы ингибирования реакций. Неконкурентный механизм соответствует экспериментальным данным для (А) AUCagg, (Б) Vagg, (В) Vsh.

В реакциях трансформации к истощенным (k_5 и k_6) и покоящимся (k_{-1}) тромбоцитам максимальные скорости и зависимости от дозы определены экспериментально. Параметры дезагрегации (k_7) сложно количественно оценить в эксперименте из-за медленного течения процесса и параллельных реакций. Оптимизация данных параметров проведена методами BH и L-BFGS в отсутствие ингибитора (Рис. 4).

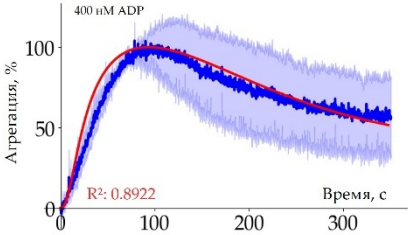


Рис. 4. Теоретическая дезагрегация (красный) близка к экспериментально наблюдаемой (синий).

При учете влияния Ilo реакции десенсибилизации не описываются простой формой неконкурентного уравнения Хилла, так как она предсказывает полное отсутствие дезагрегации в среде без ингибитора, что не подтверждается экспериментально. В реакциях k_5 и k_6 параметры EC_{50} и h для илопроста взяты равными ранее определенным значениям для реакций k_1 и k_2. В уравнениях учтена фоновая дезагрегация путем разделения реакций на составляющие k_0 и k_a.

Заключение. Таким образом, при помощи математического моделирования мы количественно охарактеризовали трансформации тромбоцитов между различными фенотипами в ответ на стимуляцию ADP и активацию cAMP/PKA сигнальной системы. Большая часть констант процессов определена экспериментально. Константы, для которых прямое экспериментальное нахождение затруднено или невозможно, определены методами оптимизации. Результаты симуляции соответствуют

экспериментальным наблюдениям для большинства процессов. Интересно, что модель воспроизводит экспериментально наблюдаемую слабую реакцию изменения формы даже при высокой дозе Ilo. Однако, мы не смогли на данном этапе исследования повторить наблюдаемое в экспериментах снижение дезагрегации с ростом времени между активацией тромбоцитов и внесением илопроста.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00142).

ЛИТЕРАТУРА

1. Aslan JE. Platelet Proteomes, Pathways, and Phenotypes as Informants of Vascular Wellness and Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021;41(3):999-1011. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314647
2. Hamad MA, Schanze N, Schommer N, Nührenberg T, Duerschmied D. Reticulated Platelets-Which Functions Have Been Established by In Vivo and In Vitro Data? Cells. 2021;10(5):1172. doi:10.3390/cells10051172
3. Baaten CCFMJ, Ten Cate H, van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet populations and priming in hematological diseases. Blood Rev. 2017;31(6):389-399. doi:10.1016/j.blre.2017.07.004
4. Belyaev AV, Dunster JL, Gibbins JM, Panteleev MA, Volpert V. Modeling thrombosis in silico: Frontiers, challenges, unresolved problems and milestones. Phys Life Rev. 2018;26-27:57-95. doi:10.1016/j.plrev.2018.02.005
5. Nechipurenko DY, Shibeko AM, Sveshnikova AN, Panteleev MA. In Silico Hemostasis Modeling and Prediction. Hamostaseologie. 2020;40(4):524-535. doi:10.1055/a-1213-2117
6. Kumar N, Cramer GM, Dahaj SAZ, Sundaram B, Celli JP, Kulkarni RV. Stochastic modeling of phenotypic switching and chemoresistance in cancer cell populations. Sci Rep. 2019;9(1):10845. doi:10.1038/s41598-019-46926-x
7. De Boer RJ, Yates AJ. Modeling T Cell Fate. Annu Rev Immunol. 2023;41:513-532. doi:10.1146/annurev-immunol-101721-040924
8. Mindukshev I, Gambaryan S, Kehrer L, et al. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. Clin Chem Lab Med. 2012;50(7):1253-1262. doi:10.1515/CCLM.2011.817
9. Mindukshev I, Fock E, Dobrylko I, Sudnitsyna J, Gambaryan S, Panteleev MA. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration. Int J Mol Sci. 2022;23(18):10667. doi:10.3390/ijms231810667

МИКРОГЛИЯ – КЛЮЧЕВОЙ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ В МОДЕЛИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ *IN VITRO*

Закаблуковская А.Е.[1], Мальцева В.Н.[1,2]

[1]ПущГЕНИ-филиал РОСБИОТЕХ – обособленное структурное подразделение «Пущинский филиал ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ», Пущино, Россия
[2]Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пущино, Россия

Введение. Микроглия, резидентные макрофаги мозга, – маленькие клетки, главной функцией которых является фагоцитоз. Они являются основными иммунными клетками ЦНС и основными клетками нейроиммунной системы головного мозга, участвующей в развитии нейровоспаления. Микроглия фагоцитирует неправильно свернутые белки, клеточный мусор и умирающие клетки для поддержания гомеостаза. Кроме того, микроглия может контролировать и защищать нейроны посредством межклеточных взаимодействий между микроглией и нейронами [1,2]. Традиционно микроглию принято рассматривать как ключевой элемент воспалительного процесса, развивающегося в нервной ткани в ответ на повреждающие воздействия [1-3]. Активация микроглии наблюдается при различных нейродегенеративных заболеваниях. Некоторые фенотипы микроглии в определенных состояниях коррелируют с патологическими признаками и связаны с определенными функциями [3-6]. Микроглия одновременно выполняет защитную функцию путем фагоцитоза и удаления патологических белковых агрегатов и может оказывать отрицательное влияние из-за чрезмерного поглощения белковых агрегатов, что может привести к нарушению фагоцитарной способности микроглии, нейровоспалению и, в конечном итоге, нейродегенерации. Внеклеточные везикулы, высвобождаемые из микроглии, и нарушение аутофагии в микроглии способствуют патологическому прогрессированию и нейродегенерации [4,5]. Активацию микроглии и соответствующее изменение ее морфологических и функциональных характеристик вызывают липополисахариды, интерферон-гамма, бета-амилоидный пептид, хромогранин А, CD-40 лиганды (CD-154), интерлейкин 1-бета, интерлейкин-6 [7]. Таким образом,

усиление микроглиального фагоцитоза, уменьшение микроглиального нейровоспаления, ингибирование синтеза и секреции микроглиальных экзосом и превращение микроглии в защитный фенотип считаются перспективными стратегиями терапии нейродегенеративных заболеваний. Изучение фенотипа и функционального состояния клеток микроглии в норме и при моделировании нейровоспаления является одной из актуальных задач нейробиологии, направленных на расшифровку тонких механизмов развития нейровоспаления, возрастных изменений головного мозга и прогрессирования нейродегенеративных заболеваний.

Методы. Для исследования состояния микроглиальных клеток использовали два метода культивирования клеток – метод получения «трикультуры» и метод культивирования глиальной культуры. В первом случае получали культуру, преимущественно состоящую из трёх типов клеток – нейронов, астроцитов и микроглии. Во втором – из микроглиальных клеток и астроцитов. Для получения всех клеточных культур использовался гиппокамп новорождённых самцов крыс линии Wistar. Извлечённый после декапитации мозг помещали в ледяной раствор Версена и отделяли гиппокамп. Полученный гиппокамп нарезали на отдельные небольшие фрагменты при помощи ножниц, после чего раствор Версена заменяли на 1% раствор папаина (в растворе Версена). Инкубацию с папаином осуществляли при 37ºС в течение 24 минут при постоянном встряхивании (500 оборотов в минуту). После отмывки и центрифугирования клеточную суспензию помещали либо в культуральные матрасы и добавляли 4 мл среды для культивирования глиальных клеток, либо в чашки Петри диаметром 35 мм и добавляли 2 мл нейробазальной среды с факторами роста. Среда для культивирования глиальных клеток состояла из DMEM/F12 (ПанЭко), 5 мл фетальной бычьей сыворотки, 0,5 мМ глутамина и пенициллина/стрептомицина (активность 100 ЕД на мл). Среда для смешанных нейрон-глиальных культур состояла из нейробазальной среды, бессывороточной добавки B27, глутамина (0,5 мМ) и пенициллина-стрептомицина (1:100) и ростовых факторов: TGFβ – 2 нг/мл, MCSF – 10 нг/мл, IL-34 – 100 нг/мл, холестерин – 1,5 мкг/мл). Клетки выращивали в CO_2-инкубаторе при температуре 37°С, влажности 95% и содержании CO_2 в атмосфере равном 5%. В качестве воздействий, моделирующих нейровоспаление, мы использовали хроническое воздействие провоспалительного агента, липополисахарида (ЛПС, 500 нг/мл) в течение 24 часов или хемотаксического формилированного пептида (ФМЛФ, 5 мкМ), а также воздействие 2-часового эпизода гипоксии (1,5% O_2 в атмосфере в течение 2 часов). В качестве контроля выступали культуры, выращенные без

каких-либо воздействий. Для оценки изменения экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциированные с воспалением и апоптотическими сигнальными каскадами, в клетках микроглии в исследуемых культурах использовали метод ПЦР-анализа в реальном времени.

Результаты. Инкубация клеток трикультур с ЛПС вызывает значительное усиление экспрессии генов, кодирующих ассоциированные с воспалением белки, такие как TL4R, STAT3, провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и IL-10, который в зависимости от условий может рассматриваться также в качестве провоспалительного (рис. 1). Также ЛПС вызывал подавление экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом, кодирующих антиапоптотические белки, такие как Bcl2 и белок теплового шока 70 (Hsp70), но при этом усиливал экспрессии Bcl-xL (рис. 1). Таким образом, ЛПС в трикультурах гиппокампа индуцирует процессы воспаления, что соотносится с его ролью провоспалительного агента. Полученные результаты, соответствуют данным литературы, где демонстрируется, что ЛПС-индуцированная активация микроглии вызывает усиление синтеза и секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β и IL-6 [4-6]. Также, согласно литературным данным, STAT3 вовлечён в микроглия-опосредованное нейровоспаление и изменение его экспрессии может выступать в качестве маркера поляризации микроглии [8], то есть смены её фенотипа. Как и ЛПС, формилированный пептид ФМЛФ является провоспалительным агентом бактериального происхождения, который способен вызывать активацию микроглии [9], однако в отличие от ЛПС, воздействующего на TL4-рецептор, ФМЛФ связывается с рецепторами формилированного пептида. При воздействии гипоксии мы наблюдали значительное снижение экспрессии генов, кодирующих провоспалительные белки, такие как IL-1β, IL-6 и SOCS3, а также усиление экспрессии антиапоптотических белков (рис.1). Подобное противоположное по сравнению с ЛПС действие гипоксии на экспрессию генов, может объясняться стимуляцией перехода микроглии в противовоспалительный фенотип М2. Также мы наблюдали изменение экспрессии каспазы 3, которая может запускать трансформацию микроглий в фенотип М2 в гиппокампе в ответ на внешний стимул.

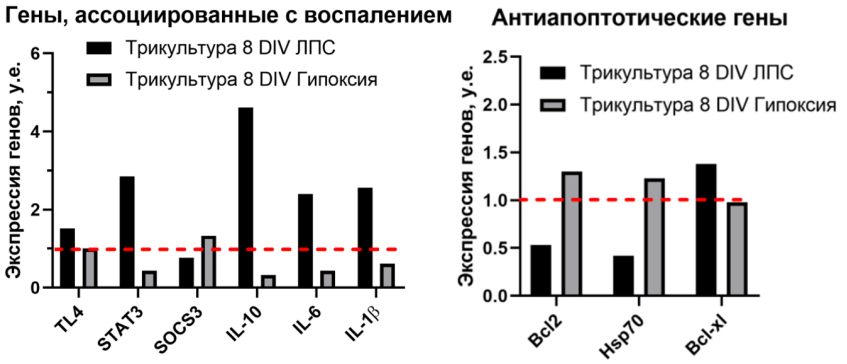


Рис. 1. Действие 24-часовой инкубации с ЛПС (100 нг/мл) и 2,5 часового эпизода гипоксии (сбор тотальной РНК через 24 часа после окончания гипоксии) на экспрессию генов, кодирующих белки, ассоциированные с воспалением (TL4 рецептор, STAT3, SOCS3, провоспалительные цитокины IL-1β, IL-6 и IL-10) и антиапоптотическими (Bcl2, Hsp70, Bcl-xL) сигнальными каскадами. Красная пунктирная линия отражает экспрессию генов в трикультурах на 8 день культивирования без каких-либо воздействий.

Выводы. Таким образом, мы отработали новый подход к моделированию нейровоспаления в культурах клеток гиппокампа *in vitro*, состоящих из функционально активных нейронов, астроцитов и микроглии. Такой подход является перспективным для изучения молекулярных механизмов развития нейропатологий, сопровождаемых нейровоспалением и оценки состояния потенциально зрелой микроглии, способной к различного рода изменениям фенотипа в зависимости от воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. Cell. 2019; 3;179(2):292-311.
2. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. Annu Rev Immunol. 2014;32:367-402.
3. Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. Signal Transduct Target Ther. 2023; 22;8(1):359.
4. Bohlen, Christopher J.; Bennett, F. Chris; Tucker, Andrew F.; Collins, Hannah Y.; Mulinyawe, Sara B.; Barres, Ben A. Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. Neuron. 2017;94(4):759-773.e8.

5. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017; 26;35:441-468.
6. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Transl Neurodegener.2020; 26;9(1):42.
7. Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. Biol Pharm Bull. 2002;25(8):945-53.
8. Zheng Z.V., Chen J., Lyu H., Lam S.Y.E., Lu G., Chan W.Y., Wong G.K.C. Novel role of STAT3 in microglia-dependent neuroinflammation after experimental subarachnoid haemorrhage. Stroke Vasc Neurol. 2022; 7 (1), 62–70.
9. Gao J., Su G., Liu J., Shen M., Zhang Z., Wang M. Formyl peptide receptors in the microglial activation. FASEB J. 2024; 38 (21), e70151.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАПАИНА КАК ФЕРМЕНТА ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СПОСОБСТВУЕТ ПОЛУЧЕНИЮ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ МИКРОГЛИИ

Тумозов И.А., Гайдин С.Г., Мальцева В.Н.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино, Россия

Введение. В современных исследованиях микроглия рассматривается как одна из ключевых популяций глиальных клеток в мозге млекопитающих. Эти клетки выполняют функции резидентных макрофагов, участвуя в нейровоспалении [1], а также регулируют синаптическую пластичность через синаптический прунинг [2]. Популяция микроглии в мозге неоднородна, и её гетерогенность может усиливаться при патологиях из-за фенотипических изменений. Для изучения нейровоспаления *in vitro* часто используют культуры первичной микроглии [3] или иммортализованные микроглиальные клеточные линии [4]. Однако полноценное моделирование воспалительного ответа в таких культурах невозможно, поскольку в таких культурах отсутствуют другие участники нейровоспаление, такие как астроциты и нейроны.

Для решения данной проблемы разрабатываются методы совместного культивирования предварительно разделённых клеточных популяций [5]. Хотя такой подход позволяет гибко варьировать условия эксперимента (время добавления клеток, их количество, предварительную обработку), он имеет недостатки. Сложности возникают при получении чистых культур из-за различий в сроках созревания клеток и необходимости их смешивания. Кроме того, отсутствие естественного микроокружения и агрессивные методы очистки (например, использование цитозина арабинозида в нейрональных культурах или интенсивное встряхивание для астроцитов) могут влиять на морфологию и физиологию клеток [6,7]. Одним из возможных решений могли бы стать смешанные трикультуры, в которых наблюдается формирование самодостаточных нейрон-глиальных сетей. В таких культурах клетки (включая микроглию) развиваются в условиях, близких к *in vivo*. Однако в классических протоколах, использующих трипсин для диссоциации и среду Neurobasal + B27, отмечается слабая пролиферация микроглии. Для решения этой проблемы предлагается дополнительно вносить ростовые факторы в культуру, но исследований в данном направлении немного [8].

Для изоляции клеток микроглии из тканей мозга при получении первичных культур используется преимущественно папаин [9]. Основываясь на этом факте, мы решили проверить, как папаин влияет на функциональное состояние и популяционный состав получаемых культур, в частности количество микроглии. В данной работе мы изучили, как влияет использование папаина, применяемого в качестве фермента для деградации внеклеточного матрикса, на популяционный состав смешанных нейрон-глиальных культур гиппокампа крысы.

Материалы и методы исследования. Смешанные нейрон-глиальные культуры и аналогичные культуры, выращенные в присутствии комбинации необходимых для пролиферации микроглии факторов, таких как TGFb, MCSF и холестерин, были получены из гиппокампа новорождённых крыс. Для деградации внеклеточного матрикса при получении клеточной суспензии использовался раствор трипсина (TRY-культуры) или папаина (PAP-культуры).

Методом флуоресцентной микроскопии была проведена оценка популяционного состава культур и физиологической активности клеток. Идентификацию нейронов и астроцитов осуществляли путём определения наличия кальциевого ответа (увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+}) на добавление хлорида калия и аденозинтрифосфата (АТФ), соответственно. Для идентификации клеток микроглии использовался флуорогенный субстрат УДФ-глюкоронозилтрансферазы. Так как указанный фермент является специфичным для клеток микроглии, краситель не трансформируется другими типами клеток в культуре.

При помощи иммуноцитохимического окрашивания были идентифицированы нейроны (антитела к NSE), астроциты (антитела к GFAP) и микроглия (антитела к IBa1) в клеточных культурах гиппокампа крыс. Также этим методом была проведена оценка наличия глутаматергических и ГАМКергических синапсов на нейронах (антитела к синаптическим маркерам vGluT2 и vGAT соответственно).

Результаты исследования. В ходе исследования было установлено, что использование папаина способствует повышению количества микроглии в PAP-культурах, по сравнению с TRY-культурами, при этом количество астроцитов и нейронов в культуре существенно не изменялось. Также было отмечено, что папаин не оказывает влияния на синаптогенез и созревание нейрональных сетей. Нами были обнаружены морфологические различия микроглии в TRY-культурах и PAP-культурах. Микроглия в PAP-культурах преимущественно поляризована, в то время как кустистая и амебоидная морфология была более характерна для TRY-культур. Нами также были обнаружены особенности кинетики загрузки и трансформации флуорогенного субстрата УДФ-глюкоронозил трансферазы CDr20 в клетках этих фенотипов. Трансформация красителя

происходит значительно быстрее в амебоидной микроглии, чем в поляризованной. Мы также продемонстрировали, что комбинация TGFβ+MCSF+холестерина увеличивает количество микроглии как в PAP-, так и в TRY-культурах (до 25-30%) и способствует появлению амебоидной микроглии, характеризующейся высокой подвижностью. Примечательно, что в TRY-культурах амебоидная трансформация микроглии наблюдалась уже на 2-й день культивирования (2 DIV), тогда как в PAP-культурах подобные изменения отмечались лишь к 7-му дню (7 DIV).

Заключение. В данной работе мы продемонстрировали, что применение папаина для расщепления межклеточного матрикса способствует созданию нейрон-глиальных культур с развитыми нейрональными и астроцитарными сетями, а также с более высокой численностью пролиферирующей микроглии по сравнению с культурами, в которых для деградации внеклеточного матрикса использовался трипсин. При этом численность нейронов и астроцитов в культурах существенно не изменялась. Такие культуры можно рассматривать как полноценные трикультуры, поскольку они содержат три ключевые клеточные популяции, а микроглия сохраняется в условиях, максимально приближенных к естественным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dadwal, Shilauni; Heneka, Michael T. (2024): Microglia heterogeneity in health and disease. In FEBS open bio 14 (2), pp.217–229. DOI: 10.1002/2211-5463.13735
2. Deus, Junia Lara de; Faborode, Oluwaseun Samuel; Nandi, Sayan (2024): Synaptic Pruning by Microglia. Lessons from Genetic Studies in Mice. In Developmental neuroscience, pp. 1–21. DOI: 10.1159/000541379
3. Pesti, István; Légrádi, Ádám; Farkas, Eszter (2024): Primary microglia cell cultures in translational research. Strengths and limitations. In Journal of biotechnology 386, pp.10-18. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2024.03.005
4. Aktories, Philipp; Petry, Philippe; Kierdorf, Katrin (2022): Microglia in a Dish-Which Techniques Are on the Menu for Functional Studies? In Frontiers in cellular neuroscience 16, p.908315. DOI: 10.3389/fncel.2022.908315
5. Roqué, Pamela J.; Costa, Lucio G. (2017): Co-Culture of Neurons and Microglia. In Current protocols in toxicology 74, 11.24.1-11.24.17. DOI: 10.1002/cptx.32
6. Dessi, F.; Pollard, H.; Moreau, J.; Ben-Ari, Y.; Charriaut-Marlangue, C. (1995): Cytosine arabinoside induces apoptosis in cerebellar neurons in culture. In Journal of neurochemistry 64 (5), pp.1980–1987. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1995.64051980.x
7. Nakayama, Saki; Adachi, Miyu; Hatano, Misaki; Inahata, Noriyuki; Nagao, Tetsuji; Fukushima, Nobuyuki (2021): Cytosine arabinoside induces phosphorylation of histone H2AX in hippocampal neurons via a noncanonical pathway. In Neurochemistry international 142, p.104933. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104933

8. Goshi, Noah; Kim, Hyehyun; Seker, Erkin (2022): Primary Cortical Cell Tri-Culture-Based Screening of Neuroinflammatory Response in Toll-like Receptor Activation. In Biomedicines 10 (9). DOI: 10.3390/biomedicines10092122
9. Woolf, Zoe; Stevenson, Taylor J.; Lee, Kevin; Jung, Yewon; Park, Thomas I. H.; Curtis, Maurice A. et al. (2021): Isolation of adult mouse microglia using their in vitro adherent properties. In STAR protocols 2 (2), p.100518. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100518.

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК), СОДЕРЖАЩИХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗОНД, ДЛЯ АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЯ АРХИКТЕКТУРЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

У Т.С.[1], Кулебякин К.Ю.[2], Путляева Л.В.[2,3]

[1]Кафедра биохимии, Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2]Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3]Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Эпигенетические модификации гистонов играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов в ходе дифференцировки стволовых клеток. При использовании классических методов исследования эпигенетики (Hi-C, ChIP seq) необходима стадия фиксации клеток, что препятствует прижизненному исследованию последовательных этапов развития единичной клетки [1]. Для решения данной задачи был разработан метод LiveMIEL (Live Microscopic Imaging of Epigenetic Landscapes), позволяющий визуализировать эпигенетические модификации гистонов и их изменение в живых клетках с помощью зондов на основе ридерных (от англ. Reader) доменов [2]. Ридерные домены играют ключевую роль в интерпретации гистонового кода клеткой, т.к. они способны специфически распознавать различные посттрансляционные модифицикации гистонов. Таким образом зонды на основе ридерных доменов обладают повышенной специфичностью и могут быть использованы для отслеживания эпигенегенетических модификаций гистонов и их изменений в живых клетках.

Одним из важных эпигенетических модификаций является триметилирование девятого остатка лизина третьего гистона (H3K9me), ассоциированное с гетерохроматином и с репрессией генов, а также участвующее в определении направления дифференцировки клеток [3]. N-концевой участок хромодомена (остатки 55-117) М-фазного фосфопротеина 8 (MPP8) человека способен специфично распознавать H3K9me3. В раннее опубликованной работе флуоресцентный зонд на основе хромодомена MPP8 был успешно применён для исследования дифференцировки человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в нейроны [2]. Было показано, что для разных этапов дифференцировки распределение H3K9me3 различается. Это позволяет выделить кластеры для отдельных стадий дифференцировки на основе мультивариабельного анализа изображений распределения H3K9me3.

Человеческие мезенхимные стволовые клетки (МСК) способны к адипогенной и к остеогенной дифференцировке, в ходе которой происходит массовая перестройка эпигенома. Это обеспечивает формирование профиля экспрессии генов, характерного для дифференцированной клетки [4]. Чтобы изучить динамику изменения эпигенетических модификации при разных направлениях дифференцировки, в нашей работе мы разработали клеточную линию МСК Asc52telo, стабильно экспрессирующих флуоресцентный зонд на основе хромодомена MPP8.

Методы. Для создания флуоресцентного зонда в качестве H3K9me3-связывающего домена мы выбрали N-концевой хромодомен (остатки 55-117) M-фазного фосфопротеина 8 (MPP8) человека. Мы использовали два хромодомена MPP8, так как в предыдущих исследованиях было показано, что распределение H3K9me3 можно наблюдать, используя зонды с двумя, но не с одним хромодоменом MPP8 [2]. В качестве флуоресцентного белка использовали мономерный флуоресцентный белок mTurquoise2, который обладает максимумом возбуждения 434 нм и максимумом эмиссии 474 нм. Для облегчения проникновения флуоресцентного зонда в ядро использовали сигнал ядерной локализации (NLS). В качестве промотора был выбран hPGK-промотор (человеческий промотор 3-фосфоглицераткиназы). Итоговая конструкция для визуализации H3K9me3 в живых клетках была создана с помощью метода клонирования MoClo [5] и получила название MPP8-mTurq.

Сборку лентивирусных частиц, содержащих последовательность MPP8-mTurq зонда и трансдукцию Asc52telo провели согласно методике описанной ранее [2]**.** Отсортировали клетки, используя флуоресцентный зонд MPP8-mTurq в качестве селективного маркёра с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Для регистрации флуоресценции использовали флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ti2, оснащённый объективом CFI Plan Fluor DL 10XF CH, NA0.3 (Nikon, Токио, Япония) и PLAN APO 60x 1.42 oil (Nikon, Токио, Япония), цифровой sCMOS камерой Photometrics Kinetix, диодным источником света CoolLED pE800.

Изображения анализировали с помощью программы NIS-Elements AR 5.42.02 (Nikon, Токио, Япония).

Результаты и обсуждение. После лентивирусной трансдукции примерно 50% популяции Asc52telo содержала MPP8-mTurq, для получения стабильной клеточной линии выбрали половину наиболее ярких клеток (23,5% из всех клеток). Популяция, из которой вывели стабильную линию, по составу сходна с родительской популяцией по таким параметрам как размер и форма (рис. 1).

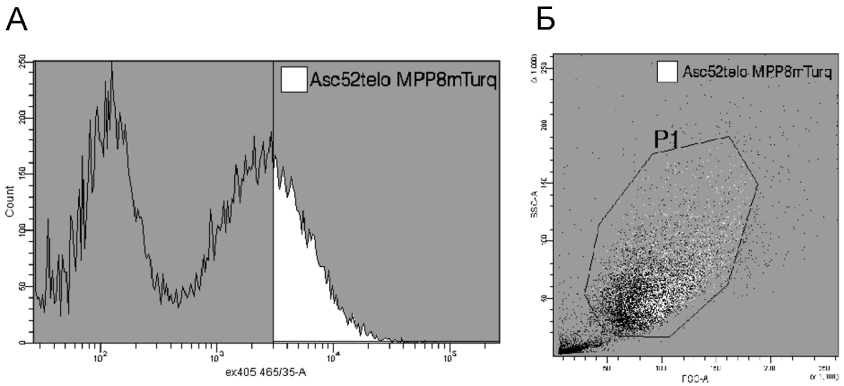


Рис. 1. Цитофлуориметрия Asc52telo после лентивирусной трансдукции MPP8-mTurq. А. Cont – количество событий, ex405 465/35-A интенсивность флуоресценции 465 нм при возбуждении длиной волны 405 нм. Для получения стабильной линии Asc52telo MPP8-mTurq выделили клетки с интенсивностью флуоресценции больше $3*10^3$. Б. SSC-A Площадь бокового светорассеяния, FSC-A Площадь прямого светорассеяния. P1 – Популяция подверженная сортировке.

Дальше методом флуоресцентной микроскопии мы анализировали полученную клеточную линию МСК Asc52telo, стабильно экспрессирующих эпигенетический зонд MPP8-mTurq. Мы показали, что сенсор позволяет визуализировать распределение модификации H3K9me3 в ядре. Паттерны её распределения различаются для каждой клетки (рис. 2.). Большинство клеток популяции в G-фазе, в них паттерн распределения H3K9me3 диффузный. Хромосомы в конденсированном состоянии отчётливо видны, особенно в стадиях клеточной деления, что говорит о том, что зонд связывается даже с труднодоступным конденсированным хроматином. Присутствие зонда MPP8-mTurq не повлияло на жизнеспособность и пролиферативный потенциал клеток. При делении клеток интенсивность сигнала не падает, что позволяет исследовать эпигенетическое состояние клеток в течение длительного времени.

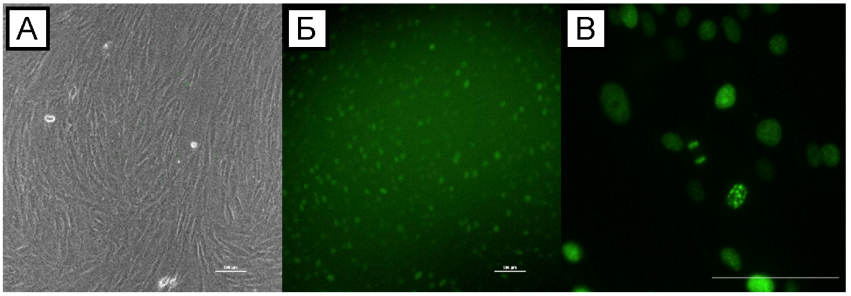


Рис. 2. Полученная клеточная линия Asc52telo MPP8-mTurq, белая линия – 100 мкм, А. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение 10х. Б. Флуоресцентная микроскопия, возбуждение 405 нм, увеличение 10х. В. Флуоресцентная микроскопия, возбуждение 405 нм, увеличение 60х.

Данная работа по разработке клеточной линии с эпигенетическим зондом является первым шагом выяснения динамики эпигенетических модификаций при разных клеточных процессах. Полученная клеточная линия Asc52telo MPP8-mTur может быть использована для исследования динамики изменения эпигенетических модификации ходе дифференцировки МСК, а также открывает возможность исследования процессов, происходящих на уровне одной клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-75-30007, https://rscf.ru/project/19-75-30007/

ЛИТЕРАТУРА

1. Halabian R, Valizadeh Arshad, Ahmadi A, Saeedi P, Azimzadeh Jamalkandi S, Alivand MR. Laboratory methods to decipher epigenetic signatures: a comparative review. Cell Mol Biol Lett. 2021;26(1):46. doi:10.1186/s11658-021-00290-9
2. Stepanov AI, Shuvaeva AA, Putlyaeva LV, et al. Tracking induced pluripotent stem cell differentiation with a fluorescent genetically encoded epigenetic probe. Cell Mol Life Sci. 2024;81(1):381. doi:10.1007/s00018-024-05359-0
3. Nicetto D, Zaret KS. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. Curr Opin Genet Dev. 2019;55:1-10. doi:10.1016/j.gde.2019.04.0139
4. Wang R, Wang Y, Zhu L, Liu Y, Li W. Epigenetic Regulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Differentiation and Osteoporosis. Stem Cells International. 2020;2020:1-17. doi:10.1155/2020/8836258
5. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. Peccoud J, ed. PLoS ONE. 2011;6(2):e16765. doi:10.1371/journal.pone.0016765

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПОСЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ

Чумарина А.И., Арсланов А.И., Силантьева Д.И., Гайнутдинов Х.Л.

Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Введение. Тревожность представляет собой сложную форму поведения, определяемую как состояние ожидания возможной угрозы, которая отсутствует в явном виде в текущий момент. При этом данная неопределённая угроза, несущая потенциальную возможность причинения вреда, воспринимается как вероятная и возможная в ближайшем будущем [1]. Хотя реакции на тревогу обычно служат для адаптации, однако при чрезмерной, неконтролируемой и генерализованной тревожности они могут стать дезадаптивными, приводя к длительному стрессу [2,3]. Состояние тревожности высших позвоночных имеет корни в их эволюционном прошлом и может проявляться у беспозвоночных животных в виде так называемых тревожно-подобных состояний. Известно, что формированиие долговременной сенситизации у моллюсков, являющейся формой поведения, близкой к такому состоянию как повышенная тревожность у высших животных, сопровождается повышением возбудимости премоторных интернейронов, а также увеличением амплитуды ВПСП [4]. Вместе с тем вопрос об изучении клеточных механизмов тревожно-подобного состояния на примере удобных для нейрофизиологических исследований объектах, таких как моллюски, и поиска модели максимально приближенной состоянию повышенной тревожности, до сих пор остается открытым. В связи с этим, целью данной работы являлось изучение влияния тревожно-подобного состояния на мембранные характеристики премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградных улиток с использованием модифицированной поведенческой модели сенситизации оборонительного поведения.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовались брюхоногие легочные моллюски вида *Helix pomatia*. Тревожно-подобное состояние вырабатывалось у группы из 9 животных по системе, схожей со схемой формирования долговременной сенситизации, путем предъявления 4 ежедневных электрических стимулов в область головы со средним интервалом 1,5 часа в течение 3 дней [5]. Затем животным давали двухдневный перерыв и далее повторяли данную серию

электрических стимуляций. Сформированность тревожно-подобного состояния определяли по изменениям в поведении, которые проявлялись в виде увеличения локомоторной активности и повышения оборонительной реакции, что соответствует тем же реакциям, возникающим у позвоночных при тревожности. Электрофизиологические измерения проводились на препаратах изолированной нервной системы по стандартной методике с применением внутриклеточных стеклянных микроэлектродов [6]. Исследовались электрические характеристики премоторных интернейронов оборонительного поведения LPa3, RPa3, LPa2 и RPa2. Проводились измерения мембранного потенциала (Vm) и амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). Контролем служила регистрация электрофизиологических характеристик у 6 улиток, которые не подвергались процедуре выработки тревожно-подобного состояния.

Результаты и их обсуждение. Анализ мембранных характеристик премоторных интернейронов выявил достоверное ($p<0,05$) снижение мембранного потенциала до -52,9±1,7 (n=16) мВ по сравнению с мембранным потенциалом интернейронов интактной группы (-59,2±2) (n=10) мВ. Исследование фоновой активности тех же нейронов оборонительного поведения показало тенденцию к снижению средней амплитуды ВПСП в экспериментальной группе животных до 1±0,1 мВ по сравнению со средней амплитудой ВПСП в группе контроля (1,3±0,3) мВ. Также было найдено, что у животных в экспериментальной группе увеличивается частота низкоамплитудных ВПСП (амплитуда от 0,2 до 1 мВ) со снижением разброса амплитуд ВПСП в этом интервале при максимальной частоте встречаемости ВПСП с амплитудами 0,5-0,6 мВ. В контрольной группе наблюдается больший разброс низкоамплитудных ВПСП, а также с меньшей частотой по сравнению с экспериментальной группой встречаются ВПСП с амплитудами 0,5-0,6 мВ. При этом в контрольной группе в фоновой активности также присутствуют ВПСП с амплитудами выше 4 мВ.

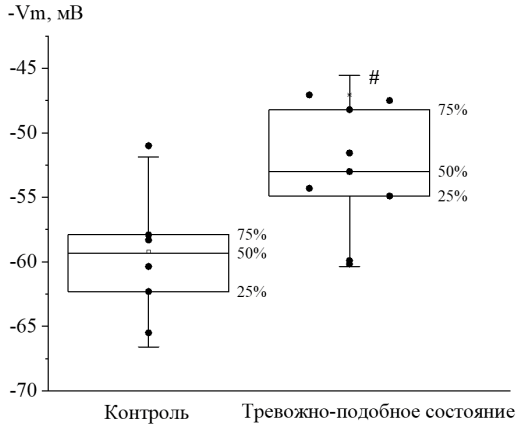


Рис. 1. Величина мембранного потенциала покоя премоторных интернейронов группы контрольных животных и группы животных с тревожно-подобным состоянием. Показаны: средние значения, медианы, 25- и 75- процентили. # - достоверное отличие средних значений Vm ($p < 0,05$).

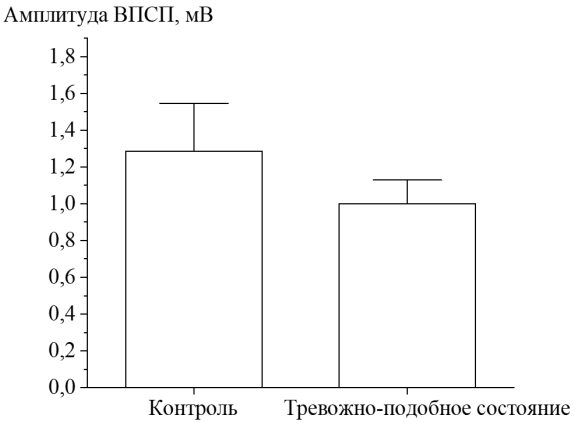


Рис. 2. Средняя амплитуда (мВ) всех ВПСП премоторных интернейронов у группы контрольных животных и группы животных с тревожно-подобным состоянием. Показаны: средние значения, стандартные ошибки среднего.

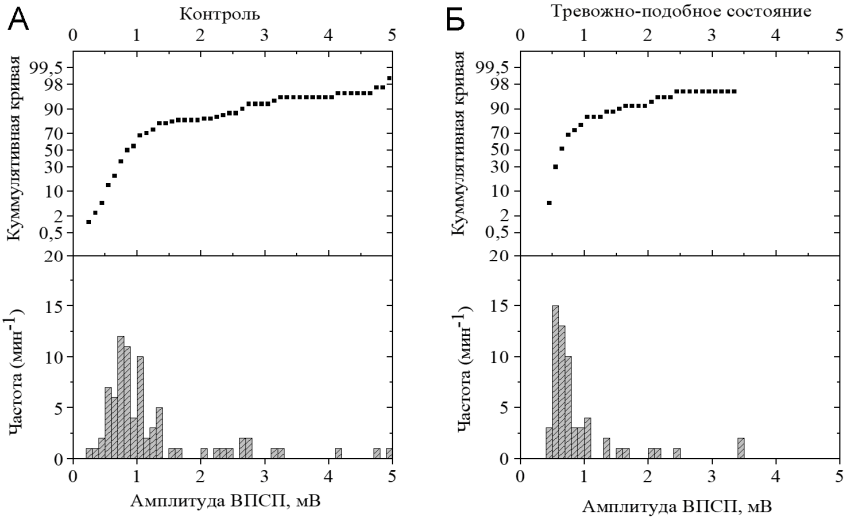


Рис. 3. Зависимость частоты появления ВПСП от их амплитуды (размер шага 0,1 мВ) и кумулятивные кривые этих зависимостей в группах животных: контрольной (А) и экспериментальной с тревожно-подобным состоянием (Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в результате формирования тревожно-подобного поведенческого состояния животных, мембранный потенциал покоя премоторных интернейронов оборонительного поведения смещается в сторону деполяризации. Анализ характеристик ВПСП, которые приходят на данные интернейроны со стороны пресинаптических нейронов, показал, что средняя их амплитуда и частота достоверно, не изменяются. Однако наблюдается тенденция к увеличению частоты низкоамплитудных ВПСП, снижению разброса амплитуд ВПСП в интервале до 1 мВ при максимальной частоте встречаемости ВПСП с амплитудами 0,5-0,6 мВ и отсутствие высокоамплитудных ВПСП величиной выше 4 мВ. Повышение количества ВПСП с амплитудами 0,5-0,6 мВ со снижением количества более низкоамплитудных после формирования тревожно-подобного состояния может быть связано с мобилизацией и облегчением соответствующих этим сигналам синаптических контактов при изменении поведения, что может быть доказано продолжением исследований с увеличением количества экспериментальных данных.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ЛИТЕРАТУРА

1. Daviu N, Bruchas M.R, Moghaddam B., Sandi C, Beyeler A. Neurobiological links between stress and anxiety. Neurobiol Stress. 2019. 11:100191.
2. Kenwood M.M, Kalin N.H, Barbas H. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology. 2022. 47(5):1141.
3. Curran K. P., Chalasani S. H. Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us. Invert Neurosci. 2012. 12:81–92.
4. Hochner B., Klein M., Schacher S., Kandel E.R. Additional in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in Aplysia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. 83:8794-8798.
5. Gainutdinov K. L., Beregovoi N. A. Long-term sensitization in the common snail: Electrophysiological correlates in the defense behavior command neurons. Neuroscience and Behavioral Physiology. 1995. 25(3):207–214.
6. Первис Р. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации ионофореза. Москва: Мир:1983.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абдыева А.А. 300
Абрамов А.Ю. 125, 156, 176, 557
Абрамочкин Д.В. 22
Абрарова Г.Ф. 425
Авдонин П.В. 614
Аджемян Д.С. 489
Алентов И.И. 462
Амерханов З.Г. 516
Ананьев А.С. 92
Андреева А.Ю. 723
Андрианова Н.В. 551
Антоненко Ю.Н. 474
Антонов В.Г. 110, 170
Антропова Ю.Г. 362, 695
Арсланов А.И. 742
Арутюнян И.В. 329
Архипов Д.В. 594
Астахова Л.А. 31
Асташев М.Е. 150
Ахмедова З.Ф. 432

Б

Бабенко В.А. 506, 551
Бабенкова П.И. 489
Бабурина Ю.Л. 304
Багдасарян А.А. 441
Баев А.Ю. 125, 128, 324, 512, 526
Баженов П.А. 156
Бакаева З.В. 644, 664
Балеев Д.Н. 291
Балезина О.П. 425
Балтина Т.В. 219
Бальчир Д.Б. 329
Басова Н.Е. 621
Батальщикова С.А. 239
Бахчинян Е. 456
Баюнова Л.В. 683
Бекшоков К.С. 73
Белинская Д.А. 24, 614
Белова С.П. 205
Бережнов А.В. 232, 419, 476, 566, 679
Богатова К.С. 609
Богачева П.О. 382, 425
Богданова Д.С. 584
Богоцкой К.А. 80
Боков Р.О. 216, 522, 563
Бондарев А.Д. 189, 719
Борзых А.А. 80, 213
Борисова М.П. 162
Борисова-Мубаракшина М.М. 605
Бочкова М.С. 711
Брезгунова А.А. 464, 551
Будаговская Н.В. 590
Букатин А.С. 650
Буян М.И. 551

В

Вавилов Н.Э. 235
Варламова Е.Г. 324, 551
Верпхвадзе Т.Ф. 235
Веселов Я.С. 31

Ветошкина Д.В. 605
Ветрова Е.А. 125
Винокуров А.Ю. 125, 156, 176, 476, 557
Войтенко Н.Г. 614
Волков Е.М. 408
Волкова А.А. 272, 723
Вологин Д.С. 280
Воронина Я.А. 97
Воронковский И.И. 333
Воронцова М.В. 199, 355, 372
Воротников А.В. 235

Г

Гаврилов М.Ю. 432, 435, 441
Газиева Ш.Ғ. 526
Гайдин С.Г. 128, 419, 734
Гайдуков А.Е. 382
Гайнуллина Д.К. 80
Гайнутдинов Х.Л. 742
Гайсина Э.А. 143
Галашин А.С. 86
Галкин Г.В. 522, 563
Гамбарян С.П. 723
Ганцова Е.А. 329
Генкина Е.Н. 446
Герда Б.А. 723
Гилиждинова К.Р. 92
Гиниатуллин А.Р. 388
Гиниятуллина Д.М. 280
Глазырин Ю.Е. 245
Голощапов А.Н. 495
Гончаров Н.В. 24, 614, 656
Горбачева Л.Р. 300
Горбушин А.К. 333
Гордон К.Б. 329
Горин Д.А. 462
Горюнов И.А. 557
Горюнов К.В. 464
Грек Д.С. 333
Грибовская В.А. 489
Гривенникова В.Г. 535
Гришина Е.В. 481
Громова Г.Е. 31
Грошева А.Г. 446
Гудков С.В. 324
Гузенко В.В. 250
Гумерова А.И. 285
Гуреев А.П. 489
Гусакова В.С. 316
Гусакова С.В. 316

Д

Давыдова М.П. 207
Дегтярева О.В. 137
Демидов В.Э. 598
Демьяненко С.В. 257
Деркач К.В. 53, 621
Джуманиязова И.Х. 22
Диденко Е.А. 53
Дмитриева С.А. 280, 285
Добрецов М.Г. 73
Добрылко И.А. 723
Дремин В.В. 557
Дубас В.И. 644
Дубинин М.В. 546, 627
Дынник В.В. 86, 232, 481
Дюкина А.Р. 672, 690

Е

Евтушенко Е.А. 452
Егоров Ю.В. 97
Егорова Т.В. 627
Елистратова И.В. 37
Ератова Л.В. 176
Еремеев А.А. 219
Есмагамбетов И.Б. 446
Ефименко А.Ю. 456

Ж

Жарова Т.В. 535
Жигачева И.В. 495
Жучков В.А. 435

З

Закаблуковская А.Е. 729
Замай Г.С. 333
Замай С.С. 699
Замай Т.Н. 245, 333, 699
Заморина С.А. 711
Замотина М.А. 372
Зарипова К.А. 205, 216
Захарова И.О. 683
Звягина А.И. 59
Згода В.Г. 235
Зингеренко Б.В. 432, 441, 452
Зиновьева А.А. 456
Зинченко В.П. 419
Зоров Д.Б. 501, 506, 551
Зоров С.Д. 506
Зорова Л.Д. 501, 506, 551

И

Иванов М.Э. 489
Иванова А.Д. 97
Иванова А.Е. 506
Иванова В.П. 632
Икромова Ф.Р. 125, 512

К

Кабанов А.В. 105
Кабанов Д.С. 291
Кабанова Н.В. 182
Каймачников Н.П. 182
Калинин А.Ю. 189
Калинин Д.В. 368
Калинина Е.А. 432, 435, 441, 452
Калинина Н.И. 362, 695, 722
Калита А.Д. 31
Калюжная Ю.Н. 260
Каменков С.С. 456
Кананыхина Е.Ю. 329
Кандалова О.В. 37
Кандурова К.Ю. 557
Каргапольцева А.С. 501
Кархов А.М. 97
Катаев А.А. 162
Катюхин Л.Н. 683
Кириченко Е.Ю. 311
Кирюхина О.О. 637
Кислухина Е.Н. 644
Кичкайло А.С. 245, 333, 699
Кобякова М.И. 338, 350
Коваленко Н.П. 105
Кожевникова Д.Д. 462
Козин С.А. 156

Козлова Е.Д. 650
Колесников С.С. 182
Коловская О.С. 333, 699
Колосков А.В. 650
Комелина Н.П. 516
Конаков М.В. 86
Корф Е.А. 656
Косарева Р.С. 189
Косенков А.М. 128, 419
Костюнина О.В. 131
Котова Е.А. 474
Кошманова А.А. 333, 699
Крайнюк Е.С. 598
Красильникова И.А. 664
Краснов К.С. 338, 350
Крестинин Р.Р. 304
Крестинина О.В. 304
Крещенко Н.Д. 41, 46, 393, 398
Крикунова Н.И. 495
Крицкая К.А. 566, 679
Крутецкая З.И. 110, 170
Крутецкая Н.И. 170
Крылова В.В. 584
Кубасов И.В. 73
Кузнецов Г.В. 41, 46
Кузьмин В.С. 97
Кулакова Е.В. 432, 452
Кулебякин К.Ю. 199, 355, 362, 372, 456, 719, 738
Кулишенко А.А. 522, 563
Куницына А.Е. 266
Куньев А.Р. 598
Курочкина Н.С. 213
Куртова Е.Е. 300
Кучин А.В. 598

Л

Лалетин В.А. 344
Лапин И.Н. 699
Ларюшкин Д.П. 419
Лебедева И.Ю. 131
Левицкая Ю.В. 526
Леднев Е.М. 235
Лизунова Н.В. 644
Лисина О.Ю. 664
Логинов В.А. 627
Ломакина А.К. 464
Ломин С.Н. 594
Ломовская Я.В. 304, 338, 350
Ломовский А.И. 304, 350
Лузан Н.А. 333, 699
Лукьяненко К.А. 333, 699
Львова И.Д. 228, 563
Лямзаев К.Г. 501
Ляпон А.О. 37

М

Майоров С.А. 128, 419
Макарова Н.П. 432, 435, 441, 452
Маломуж А.И. 403
Мальцева В.Н. 566, 729, 734
Марков М.А. 207
Масулис И.С. 105
Махмудов А.Р. 125
Махновский П.А. 213
Мельницкая А.В. 110
Мещерякова Е.И. 338, 350
Миленина Л.С. 170
Миль Е.М. 495

Минайчев В.В. 59
Миндукшев И.В. 272, 650, 656, 723
Митрошина И.Ю. 672
Митьковский Д.Е. 52, 393, 398
Мифтахова Р.Р. 143
Моисеева Е.О. 462
Морозов Е.В. 699
Московцев А.А. 664
Мохов А.А. 699

Н

Надеев А.Д. 679
Назаров И.Р. 53
Народов А.А. 333
Нвосу Ч.Д. 311
Небесная К.С. 128, 526
Немировская Т.Л. 216
Непша О.С. 432
Нестеров С.В. 529, 535
Нестерова В.В. 489
Никитина Е.Р. 73, 116, 573, 683
Никифоров А.А. 116
Никишин Д.А. 705
Никишина Ю.О. 705
Николаева Д.А. 31
Новождён М.В. 535
Новожилов А.В. 656
Нуруллин Л.Ф. 408

П

Павлов В.С. 368
Павлова Е.К. 541
Павлова С.И. 546
Панкратьева П.А. 213
Пантелеева А.А. 501
Певзнер И.Б. 464, 506, 551
Петров А.М. 92
Печальнова А.С. 53, 621
Печкова М.Г. 80, 637
Пименов О.Ю. 232
Плотников Е.Ю. 464, 489, 501, 506, 551
Погонялова М.Ю. 176, 476
Подкуйченко Н.В. 235
Поликарпова А.В. 627
Пономарева А.А. 280, 285
Попов Д.В. 213, 235
Попов Д.Ю. 476, 557
Попова П.И. 614
Потапова Д.А. 382
Потапова Е.В. 557
Поцелуева М.М. 162
Призова Н.К. 598
Прокофьев В.В. 446
Проскура А.Л. 66
Пустовит О.Б. 97
Путляева Л.В. 738
Пшемыский М.А. 316
Пятина К.В. 59

Р

Раззокков Дж.И. 125
Расулов М.М. 495
Ратушняк А.С. 66
Рашимова А.Д. 605
Рогачевская О.А. 182

Родькин С.В. 311, 318
Рощина В.В. 598
Рустамов Х.Р. 125, 128
Рыжих Ю.С. 605
Рыжова И.В. 414
Рябова Е.И. 446
Рязанцева П.Е. 419

С

Сабирова Д.Э. 219
Савельева Е.И. 614
Савельева Е.М. 594
Самарцев В.Н. 541, 546
Сариев А.У. 324
Сафронова В.Г. 672, 690
Себенцова Е.А. 300
Семенова А.А. 627
Семенович Д.С. 501, 506
Семерня Е.П. 324
Сергеев И.С. 462
Сергиевич Л.А. 598, 604
Сибгатуллина Г.В. 224
Сидельников Н.И. 291
Сидоренко Д.А. 216, 228, 563
Силантьева Д.И. 742
Силачев Д.Н. 432, 464, 489, 506
Симоненко С.Д. 300
Ситдикова Г.Ф. 92
Скверчинская Е.А. 650
Смаглий Л.В. 316
Смажило К.Ю. 355, 372
Смекалова А.А. 131
Смирнов И.П. 235
Соболева А.Г. 329
Соколов В.В. 182
Солдатова А.В. 324
Солтани Г.А. 598
Сорокоумов В.Н. 53
Сорокоумов Е.Д. 66
Сотникова Л.Д. 304
Степанов А.В. 73
Стопницкий А.А. 512
Сулягина В.П. 189
Сурин А.М. 196, 644, 664
Сухих Г.Т. 436, 506
Сыров В.Н. 526
Сысоева А.П. 432, 435, 441, 452
Сюткина В.В. 695

Т

Тарасова Е.О. 425
Тарасова О.С. 80, 637
Терпугов Е.Л. 137
Тимганова В.П. 711
Ткачук В.А. 344, 362, 695
Тобиас Т.В. 414
Токмакова А.Р. 224
Томилова А.О. 235
Тумозов И.А. 734
Туровский Е.А. 324, 551
Туртикова О.В. 522
Тыганов С.А. 205, 216
Тюрин-Кузьмин П.А. 189, 199, 362, 372, 456, 719

У

У Т.С. 738
Усанина Д.Ю. 711
Усачёв В.А. 199, 355, 372
Устинова А.С. 627

Ф

Фадеев Р.С. 338, 350
Фадеева И.С. 59, 338
Фатхудинов Т.Х. 329
Федорова М.С. 368
Федорчук И.В. 621
Федотова Е.И. 232, 476, 566, 679
Федотовская В.Д. 333, 699
Федотчева Н.И. 481
Фейсханов А.К. 143
Филатова А.А. 368
Филатова Т.С. 22, 97
Филина Ю.В. 143, 672
Филиппов Ю.А. 73
Филиппова О.И. 650
Фомин Е.О. 501
Фролова В.С. 705

Х

Хайбулаева Л.М. 598
Хорошавина Е.И. 627

Ц

Цай А.А. 232

Ч

Чарышникова О.С. 526
Чеботарева М.А. 683
Черепанова А.А. 627
Черкесова К.С. 551
Чернышев В.С. 435, 462
Чесноков Ю.М. 535
Чечехин В.И. 189, 344, 362, 456, 695, 719
Чечехина Е.С. 189, 456
Чумарина А.И. 742

Ш

Шадрина А.А. 219
Шакирова К.М. 329
Шарапов М.Г. 566
Шардина К.Ю. 711
Шарипов Р.Р. 664
Шарло К.А. 216, 228, 563
Швед Н.А. 699
Шевцова Ю.А. 432
Шевырина В.А. 66
Шемарова И.В. 573
Шенкман Б.С. 205, 522, 563
Шерстобитов А.О. 116
Шестакова М.В. 235
Шовкун М.М. 598
Шпаков А.О. 53, 621
Шуколюкова Е.П. 683

Щ

Щебетина М.В. *372*
Щербакова Л.Н. *189*

Я

Ягужинский Л.С. *529, 535*
Яковлева О.В. *609*
Якупова Э.И. *235*
Яшин В.А. *598*
Ященок А.М. *462*

V

Vittorio de Franciscis *333*

Научное издание

Международная конференция
РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ
(19-23 мая 2025 г.)
Сборник статей

Том 2

Под редакцией
А.В. Бережнова, Е.И. Федотовой

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 07.05.2025. Формат 60x84$_{1/16}$ Бумага офсетная
Печать цифровая. Печ. л. 21,97.
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

ISBN 978-5-6049994-3-1

ISBN 978-5-6049994-5-5

НАШИ ПАРТНЕРЫ

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, реагентики, так и по подбору необходимого оборудования для Ваших исследований. Обращайтесь в нашу Компанию, и Вы обязательно останетесь довольны! **www.biopik.ru**

Молекулаб – ваш надежный партнер в оснащении лабораторий Мы поставляем высококачественное оборудование и расходные материалы для лабораторий.
Наши преимущества:
· Прямые контракты с производителями – отсутствие посредников, выгодные цены
· Короткие сроки поставки импортного оборудования и реагентов;
· Надежная логистика с контролем условий хранения (температура, влажность)
· Гарантийная поддержка и консультации по продукции
· Ориентация на долгосрочное сотрудничество с лабораториями и торговыми организациями.
Наша миссия: обеспечение научных, медицинских лабораторий в области геномики, протеомики, микробиологии, клеточной биологии и криминалистики оборудованием, реагентами и расходными материалами с оперативной доставкой и профессиональной поддержкой. Посетите наш интернет-магазин **www.moleculab.ru**, где можно ознакомиться с полным портфолио нашей компании, оформить заказ или получить консультацию.

Диаэм – первая российская компания, ориентированная на комплексное оснащение научных лабораторий биологических, химических и медицинских учреждений, а также лабораторий биотехнологических, фармацевтических и химических производств, государственных контрольных и экспертных лабораторий.
Каталог компании насчитывает десятки тысяч товарных позиций оборудования, расходных материалов и реактивов.
Высококвалифицированные специалисты Диаэм проконсультируют по любым вопросам и помогут подобрать оборудование под индивидуальные задачи заказчика.
Собственный сервисный центр Диаэм производит пуско-наладочные работы и обучение пользователей, гарантийный и послегарантийный ремонт, профилактическое техническое обслуживание.
На сайте **http://www.dia-m.ru** и с помощью мобильного приложения легко найти интересующий товар, проверить наличие на складе, сделать заказ и отследить его выполнение.
Адрес: 129345, Москва ул. Магаданская д. 7 корп. 3**.** Тел.: +7(495)745-05-08, 8(800)234-05-08. E-mail: **info@dia-m.ru**, **www.dia-m.ru**, **https://t.me/mskdiam**