

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
(СПбГУ)

УДК 612.7 591.17
Per № НИОКТР
AAAA-A19-119032190039-0
Инв.№ ID: 76892647

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ
_____ Е.В. Лебедева
« » _____ 20__ г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Молекулярное разнообразие и функциональное взаимодействие Na,K-
АТФазы и клаудинов: 2021 г. этап 4
(промежуточный)
по гранту РФФ
№ 18-15-00043 от 16.04.2018

Руководитель НИР,
профессор,
доктор биологических наук



подпись

И.И. Кривой

Санкт-Петербург
2022

Реферат

Данный проект направлен на изучение молекулярного разнообразия мембранного транспортного белка Na,K-АТФазы и белков межклеточного транспорта суперсемейства клаудинов. **Методы и подходы:** Моделирование повышения уровня циркулирующего убаина с помощью его внутрибрюшинного введения крысам. Моделирование условий гравитационной разгрузки методом антиортостатического вывешивания задних конечностей крысы. Моделирование эндотоксемии с помощью введения липополисахарида в среду инкубации культуры клеток IPEC-J2. Моделирование влияния ионизирующего излучения и гипоксии. **Объектом исследования** в проекте послужили крысы Вистар и мутантные мыши с моделью бокового амиотрофического склероза (FUS), дисферлинопатии (Bla/J) и миодистрофии Дюшенна (mdx). **Используемые методы:** внутриклеточная регистрация с помощью стеклянных микроэлектродов; регистрация в камере Уссинга электрофизиологических показателей и парацеллюлярной проницаемости тканей; вестерн-блот анализ; иммуногистохимия; электронная и световая микроскопия; фармакологический анализ; иммуноферментный анализ уровня циркулирующего убаина и кортикостерона, электрохимическая детекция лактата и глюкозы. Ряд измерений произведен биохимическими методами. **Результаты работы показали:** взаимосвязь между уровнем мембранного холестерина и распределением $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в области концевой пластинки, а также роль холестерина во взаимодействии $\alpha 2$ -изоформы с холинорецептором. Обнаружены существенные отличия в стабильности липидупорядоченной фазы мембраны концевой пластинки у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза, несмотря на существенное перераспределение $\alpha 2$ -изоформы и холинорецептора в мембране после удаления части мембранного холестерина, молекулярное взаимодействие этих белков сохраняется. Данные свидетельствуют о нарушении механизма везикулярного транспорта церамида у этих мышей, что дополнительно подчеркивает отличия в стабильности липидной фазы мембраны этих мышей по сравнению с контрольными мышами. В экспериментах по изучению роли липидного окружения в функционировании клаудинов оценена возможность существования функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов, изменение тока «короткого замыкания» при действии MbCD может указывать на потенциально важную роль липидного окружения в модуляции этого взаимодействия. Впервые в условиях *in vivo* показано, что только хронически циркулирующий убаин способен модулировать электрогенную активность Na,K-АТФазы и электрогенез скелетной мышцы, что может быть основой протективных свойств убаина в условиях моделирования гравитационной разгрузки. У этих же крыс однократное введение убаина вызывало снижение проницаемости эпителия без изменений электрофизиологических параметров и экспрессии белков плотных контактов в тощей кишке. Однако превентивное однократное введение убаина перед антиортостатическим вывешиванием оказывало протективное действие, увеличивая ток «короткого замыкания», а также экспрессию клаудинов-1, -2 и окклюдина. Напротив, в лобных долях головного мозга само по себе введение убаина приводило к снижению уровня клаудина-5, в том числе, в условиях вывешивания. В экспериментах с моделированием ионизирующего излучения установлена оптимальная доза излучения 10 Гр с пострadiaционным периодом 72 ч. Тенденция к увеличению ТБК-активных продуктов в сыворотке крови может свидетельствовать о характерных для ионизирующего излучения признаках оксидативного стресса (генерация активных форм кислорода и последующих процессов свободнорадикального повреждения макромолекул). В тощей кишке наблюдалось увеличение уровня «уплотняющего» клаудина-1 и порообразующего клаудина-2, что свидетельствует о большой потере воды у животных с кишечной формой острой лучевой болезни. Ткань толстой кишки была сравнительно резистентна к воздействию излучения, что может быть связано с различным спектром белков плотных контактов, экспрессируемых в разных отделах кишки. Эксперименты на диафрагмальных мышцах крысы показали снижение мембранного потенциала покоя, наиболее выраженное в постсинаптическом районе сарколеммы. Эта деполяризация была обусловлена снижением общей электрогенной активности $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na,K-АТФазы, причем активность $\alpha 2$ -изоформы по всей мембране практически отсутствовала. В опытах *in vivo* с применением барокамеры моделировали условия гипобарической гипоксии в течение 3-х ч при атм. давлении 530 либо 370 мм рт.ст. Обнаружена долговременная (24

ч) гиперполяризация сарколеммы за счет увеличения электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы, которая вероятно обусловлена повышением плотности ее распределения в мембране. Показано влияние кратковременной гипобарической гипоксии на барьерные и транспортные процессы преимущественно в ткани толстой кишки. Все изменения сопровождались устойчивым снижением уровня циркулирующего эндогенного убаина и увеличением уровня ТБК-активных продуктов. Уровень кортикостерона, редокс статус и активность лактатдегидрогеназы не изменялись. В условиях острой гипоксии *in vitro* создавали замену оксигенации перфузирующего раствора карбогеном (95% O₂+5% CO₂) на азотсодержащую смесь (95% N₂+5% CO₂) с последующей реоксигенацией карбогеном. Обнаружено, что ткани тощей и толстой и кишки были резистентны к влиянию острой гипоксии. Однако такая гипоксия в условиях *in vitro* уже через 15 мин вызывала гиперполяризацию сарколеммы (также, как и при гипобарической гипоксии), которая сохранялась в течение 60 мин и была обратимой при реоксигенации карбогеном. При хроническом введении преднизолона мышам впервые обнаружено, что помимо уплотняющих клаудинов-1, -3, -5, участвующих в организации гематоэнцефалического барьера, обнаружен также порообразующий клаудин-2, что важно для понимания механизма регуляции ионного и водно-солевого баланса в этой структуре.

Введение

Способность функциональных и регуляторных белков (рецепторы, ионные каналы, транспортеры и др.) экспрессироваться в различных молекулярных формах хорошо известна. Такое молекулярное разнообразие лежит и в основе функционального разнообразия каждого такого белка. Выяснение функциональной специализации разных молекулярных форм белка стало одной из самых актуальных проблем клеточной биологии и физиологии. Данный проект направлен на разработку этой проблемы на примерах молекулярного разнообразия мембранного транспортного белка Na,K-АТФазы и белков межклеточного транспорта суперсемейства клаудинов. Различные молекулярные формы этих транспортных белков отличаются ткане-специфичностью экспрессии, способностью образовывать мультимолекулярные функциональные комплексы, а также особенностями локализации в специализированных микродоменах мембраны.

Na,K-АТФаза – один из наиболее распространенных интегральных белков плазматической мембраны животных клеток. Выявлены существенные различия в экспрессии, локализации и механизмах регуляции четырех изоформ каталитической и транспортной альфа-субъединицы Na,K-АТФазы. В частности, активность этого фермента критически важна для поддержания электрогенеза, возбудимости и сократительной функции скелетных мышц, которые ко-экспрессируют альфа1- и альфа2-изоформы Na,K-АТФазы. Предполагается, что основную насосную функцию выполняет изоформа альфа1, тогда как альфа2-изоформа выполняет дополнительную регуляторную функцию, которая изучена недостаточно. Нормальное функционирование Na,K-АТФазы скелетных мышц чрезвычайно важно для поддержания здорового образа жизни. Изоформ-специфичность функционирования Na,K-АТФазы в зависимости от двигательной активности во многом остается неясной, в настоящее время интенсивно исследуется и является одним из предметов изучения в данном проекте.

Интегральные белки плазматической мембраны семейства клаудинов (24 члена семейства), входящие в состав структуры плотных контактов, являются основными молекулярными детерминантами, определяющими парацеллюлярную проницаемость и барьерные свойства эпителия и эндотелия. Актуальной задачей барьерологии является исследование тканевой и органной специфической экспрессии клаудинов, их функциональной роли и особенностей регуляции в разных органах и тканях. Особое внимание уделяется вопросу кластерной организации клаудинов и их взаимодействий с молекулярным окружением.

Новейшие разработки, включая наши данные, свидетельствуют о существовании функционального взаимодействия между Na,K-АТФазой и клаудинами. Основным инструментом в исследованиях этого взаимодействия является специфический лиганд Na,K-АТФазы убаин, рецептором для которого служит альфа-субъединица Na,K-АТФазы. В настоящее время доказано существование эндогенного аналога убаина, который синтезируется в коре надпочечников и в гипоталамусе, циркулирует в наномолярном

диапазоне концентраций и рассматривается в качестве важного физиологического регулятора.

Научная новизна проекта заключается в первой попытке комплексного исследования молекулярного и функционального разнообразия, особенностей локализации и механизмов регуляции Na,K-АТФазы и клаудинов, а также функционального взаимодействия между этими представителями двух классов транспортных белков. Применение экспериментальных моделей нарушения двигательной функции, гравитационной разгрузки, эндотоксемии, ионизирующего излучения, гипоксии делает проект исключительно актуальным с точки зрения поиска подходов к высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения.

Основная часть отчета о НИР

Для изучения роли изоформ-специфичности функционирования и взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов применены следующие подходы:

I. Исследование роли липидного окружения. На модели бокового амиотрофического склероза (FUS) выявлено снижение плотности распределения $\alpha 2$ -изоформы в диафрагмальной мышце мышей FUS, аналогичное обнаруженному нами ранее у мышей с моделями дисферлинопатии и миодистрофии Дюшенна (Bla/J и mdx). Таким образом, у всех трех моделей (FUS, Bla/J и mdx), принципиально отличающихся по молекулярным механизмам нарушений двигательной активности, наблюдается сходное нарушение мембранной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в диафрагмальной мышце. Установлено, что влияние частичного удаления мембранного холестерина с помощью MbCD на распределение $\alpha 2$ -изоформы намного сильнее выражено у мышей FUS. Попытки с применением флуоресцентного аналога церамида выявили нарушение механизма везикулярного транспорта церамида у мышей FUS. Применение MbCD в культуре клеток гладких мышц A7r5 подтвердило, что функциональное взаимодействие $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с молекулярным окружением, важные для реализации внутриклеточного Ca^{2+} сигналинга, существенно зависит от мембранного холестерина и реализуется в специализированных микродоменах плазматической мембраны. При внутривенном введении MbCD *in vivo* изменений барьерных свойств ткани тощей и толстой кишки не обнаружено. Однако выявлена способность MbCD модулировать экспрессию клаудинов-1 и -5 в эндотелии кровеносных сосудов головного мозга. При остром (*in vitro*) применении MbCD зарегистрировано увеличение тока «короткого замыкания» в ткани тощей кишки, которое может быть связано с изменением активности Na,K-АТФазы и косвенно указывает на роль липидного окружения в модуляции функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов.

II. Моделирования гравитационной разгрузки. Однократное введение убаина (1 мкг/кг) неспособно предотвращать вызываемую вывешиванием деполяризацию мембраны в камбаловидной мышце крысы. Только хронически циркулирующий убаин способен модулировать электрогенную активность Na,K-АТФазы и электрогенез мышцы, что может быть основой протективных свойств убаина в условиях моделирования гравитационной разгрузки. Напротив, в тканях тощей и толстой кишки, а также лобных долей головного мозга, уже при однократном введении убаина проявлялась его способность модулировать экспрессию клаудинов-1, -2, -5 и окклюдина и предотвращать вызываемые вывешиванием нарушения в тканях кишки.

III. Моделирования эндотоксемии. Убаин (10 нМ) способен предотвращать вызванное липополисахаридами (LPS) нарушение барьерных свойств монослоя клеток линии IPEC-J2 за счет увеличения уровня «уплотняющих» клаудинов-1 и -3 без изменения уровня клаудина-5. Данные подтверждают функциональную значимость взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов в условиях моделирования эндотоксемии *in vitro*.

IV. Ионизирующее излучение. Анализ дозо-чувствительности эпителия тощей кишки крысы по изменениям барьерных свойств показал, что оптимальной для дальнейших исследований является доза общего ионизирующего излучения 10 Гр с пострadiационным периодом 72 ч. Наблюдалось увеличение уровня «уплотняющего» клаудина-1 и порообразующего клаудина-2, ткань толстой кишки была сравнительно резистентна к воздействию излучения. В диафрагмальных мышцах этих же крыс выявлена

деполяризация сарколеммы, обусловленная предположительно снижением электрогенной активности $\alpha 2$ - изоформы Na,K-АТФазы.

V. Моделирование гипоксии. В опытах *in vivo* с применением барокамеры моделировали условия гипобарической гипоксии в течение 3-х ч при атм. давлении 530 либо 370 мм рт.ст. Гипоксию в условиях *in vitro* создавали заменой оксигенации перфузирующего раствора карбогеном на азотсодержащую смесь с последующей реоксигенацией. Данные свидетельствуют об изменении барьерных и транспортных процессов в эпителии тощей и толстой кишки крысы только при гипобарической гипоксии. В диафрагмальной мышце гипобарическая гипоксия вызывала долговременную (24 ч) гиперполяризацию сарколеммы за счет увеличения электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Эти изменения сопровождались устойчивым снижением уровня, циркулирующего эндогенного убаина и увеличением уровня ТБК-активных продуктов. Уровень кортикостерона, редокс статус и активность лактатдегидрогеназы не изменялись. Гипоксия в условиях *in vitro* в течение 15 мин вызывала аналогичную по величине гиперполяризацию диафрагмальных мышц, которая, однако, была обратимой при реоксигенации карбогеном.

VI. Влияние преднизолонa на уровень клаудинов в ткани мозга. Впервые в ткани мозга, помимо уплотняющих клаудинов-1, -3, -5, участвующих в организации гематоэнцефалического барьера, обнаружен также порообразующий клаудин-2, что важно для понимания механизма регуляции ионного и водносолевого баланса в гематоэнцефалическом барьере. Внутримышечное введение преднизолонa (70 мг/кг) в течение семи суток модулирует экспрессию клаудинов-1, -2 и -3 без изменения их локализации в кровеносных сосудах. Учитывая, способность глюкокортикоидов модулировать Na,K-АТФазу, эти данные дополнительно подтверждают возможность функциональной связи между Na,K-АТФазой и клаудинами *in vivo*.

Заключение

В опытах с новыми экспериментальными моделями функциональных нарушений и воздействий получены дополнительные подтверждения высокой степени пластичности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в мышечной ткани по сравнению с функционально стабильной $\alpha 1$ -изоформой. Клаудин-1, экспрессируемый всеми эпителиальными клетками, характеризуется гораздо большей способностью к адаптивному ремоделированию по сравнению с прочими исследованными клаудинами. Опыты с дестабилизацией липидупорядоченной фазы плазматической мембраны подтверждают важность липидного окружения в такой функциональной специфичности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы и клаудина-1. Результаты подтверждают также физиологическую значимость функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов, в частности в условиях эндотоксемии.

Наиболее значимые публикации

1. **статья (WoS CC, квартиль Q1):** Kravtsova, V.V.; Paramonova, I.I.; Vilchinskaya, N.A.; Tishkova, M.V.; Matchkov, V.V.; Shenkman, B.S.; Krivoi, I.I. Chronic Ouabain Prevents Na,K-ATPase Dysfunction and Targets AMPK and IL-6 in Disused Rat Soleus Muscle. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3920. doi:10.3390/ijms22083920.

2. **статья (WoS CC, квартиль Q2):** Livanova AA, Fedorova AA, Zavirsky AV, Bikmurzina AE, Krivoi II, Markov AG. Dose and time dependence of functional impairments in rat jejunum following ionizing radiation exposure. *Physiol Rep.* 2021, 9(15): e14960. doi:10.14814/phy2.14960.

3. **статья (WoS CC, квартиль Q4):** Kravtsova V.V., Krivoi I.I. Molecular and Functional Heterogeneity of Na,K-ATPase in the Skeletal Muscle. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2021. 57: 835-851. doi: 10.1134/S0022093021040086.

Публикации в сборниках тезисов:

1) Kravtsova V.V., Tishkova M.V., Krivoi I.I. EFFECTS OF CIRCULATING OUABAIN IN THE RAT SOLEUS MUSCLE UNDER CONDITIONS OF MODELING GRAVITATIONAL UNLOADING. XVII International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for Medicine and Psychology». Sudak, Crimea, Russia; May 30-June 10, 2021. p.209-210. <http://brainres.ru/>

2) Кривой И.И. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И ПЛАСТИЧНОСТЬ Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ. Новые подходы к изучению проблем физиологии экстремальных состояний. Материалы X Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти И.Б. Козловской и приуроченной к году науки, и технологий. Москва, Россия; 28 июня –1 июля. 2021. p.101. <http://mer.imbp.ru>.

3) Тишкова М.В., Кривой И.И. ПРЕВЕНТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ УБАИНА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ. XXVII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2021». Санкт-Петербург, Россия; 25-26 марта. 2021. P.195-196. <http://pathophysiology.ru/conference.html>

4) Федорова А.А. ЦИРКУЛИРУЮЩИЙ УБАИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИНДУЦИРОВАННОЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ПОВРЕЖДЕНИЕ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫС. XXIV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». Санкт-Петербург, Россия; 24 апреля, 2021. p.820-821. <https://events.spbu.ru/events/science-and-medicine-2021>

5) Горобец С.С., Бикмурзина А.Е., Марков А.Г. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛАУДИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС. Всероссийская конференция с международным участием "Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии". Казань, Россия; 27 февраля, 2021. p.35-36. <https://lomonosov-msu.ru/rus/event/6499/>

6) Федорова А.А., Кривой И.И., Марков А.Г. ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО УБАИНА ПРЕДОТВРАЩАЕТ СНИЖЕНИЕ ТРАНСЭПИТЕЛИАЛЬНОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ В ТОЩЕЙ КИШКЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОТОКСЕМИИ. Национальная (Всероссийская) конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2020». Санкт-Петербург, Россия; 24 декабря. 2020. p.543-544. Опубликовано в апреле 2021. <https://events.spbu.ru/events/science-2020>.

7) Fedorova A.A., Krivoi I.I., Markov A.G. CIRCULATING OUABAIN PROTECTS RAT INTESTINE EPITHELIAL BARRIER UNDER SIMULATING OF GRAVITATIONAL UNLOADING. Международная конференция по естественным и гуманитарным наукам – «Science SPbU – 2020». Санкт-Петербург, Россия; 25 декабря. 2020. стр. 488-489. Опубликовано в апреле 2021. <https://events.spbu.ru/events/science-spbu>.

Описание вклада в работу каждого из участников, допустима оценка в процентах (учётная форма ЦИТиС)

Кривой Игорь Ильич, руководитель - 30%

Кравцова Виолетта Васильевна, ответственный исполнитель - 24%

Марков Александр Георгиевич, ответственный исполнитель - 23%

Федорова Арина Александровна, ответственный исполнитель - 23%

Отчёт **НЕ** содержит информацию составляющую коммерческую тайну

Коды **ОЭСР** (Классификатор, разработанной Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР))

1.06 Биологические науки, Биохимия и молекулярная биология

3.01 Фундаментальная медицина, Физиология