

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ,  
ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА II ВСЕРОССИЙСКУЮ КОНФЕРЕНЦИЮ  
«ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ, ТРАНСПОРТ, ЦИТОСКЕЛЕТ»  
(Санкт-Петербург, 20—22 октября 2015 г.)**

**МЕХАНИЗМ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОМОЦИСТЕИНА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА И МОЗЖЕЧКА КРЫС IN VITRO.** © П. А. Абушик, Ю. Д. Степаненко, Т. В. Карелина, Д. А. Сибаров, С. М. Антонов. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, polinaabushik@gmail.com

Серосодержащая аминокислота гомоцистеин вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний. Однако механизм его нейротоксического действия остается малоизученным. Ранее было показано, что гомоцистеин, подобно глутамату, может связываться с ионотропными рецепторами глутамата NMDA-типа и метаботропными рецепторами глутамата I группы, а следовательно, может быть рассмотрен как эндогенный избирательный агонист данных типов рецепторов. Цель работы состояла в исследовании механизмов нейротоксического действия гомоцистеина на нейроны коры мозга и мозжечка крыс *in vitro*. Долговременное действие гомоцистеина (500 мкМ, 24 ч) вызывало гибель нейронов коры мозга и мозжечка крыс. Доля живых клеток после действия гомоцистеина составила  $44.2 \pm 3.1$  % для нейронов коры мозга и  $36.2 \pm 7.1$  % для нейронов мозжечка крыс. Для исследования начальных механизмов действия гомоцистеина были сопоставлены внутриклеточные кальциевые ответы, вызванные гомоцистеином, с ответами на NMDA и глутамат. В нейронах коры и мозжечка наблюдалась одинаковая тенденция — гомоцистеин вызывал кальциевые ответы осцилляторного характера, в то время как NMDA и глутамат вызывали «классическое» постепенное увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Более того, в экспериментах по изменению митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\varphi_{mit}$ ) с помощью флуоресцентного зонда родамин-123 было показано, что в нейронах коры мозга крыс на начальных этапах действия (6 мин) гомоцистеин в отличие от NMDA и глутамата не вызывал падения  $\Delta\varphi_{mit}$ . Однако при его длительном действии (60 мин), как и в случае NMDA и глутамата, развивалось изменение  $\Delta\varphi_{mit}$ , сопоставимое с полным падением  $\Delta\varphi_{mit}$  при разобщении дыхательной цепи протонофором FCCP. В связи с тем что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) вовлечен в активацию нейропротекторных сигнальных путей, было интересно исследовать его влияние на нейротоксический эффект гомоцистеина. Форсколин (1 мкМ) как избирательный активатор синте-

за цАМФ полностью предотвращал гибель нейронов, вызванную гомоцистеином после 24 ч действия. Для определения вторичноактивируемых каскадов, вовлеченных в нейропротекторный сигнальный путь, были проведены эксперименты с ингибитором протеинкиназы А (РКА), блокатором протеинкиназы С (РКС) хелеритрином и ингибитором кальмодулинзависимой киназы II (СамКII) KN93. Ингибирование РКА при действии форсколина снижало его нейропротекторный эффект. Это можно рассматривать в качестве «контроля», так как известно, что цАМФ напрямую активирует РКА. Интересно, что блокирование РКС достоверно не снижало нейропротекторного эффекта форсколина при долговременном действии на нейроны коры мозга и нейроны мозжечка крыс, тем самым исключая вклад РКС в нейропротекцию. Наиболее эффективно нейропротекторный эффект форсколина снижал KN93, что определяет СамКII как участника вторичного каскада нейропротекторного сигнального пути. Полученные результаты демонстрируют, что в нейронах коры мозга и мозжечка крыс *in vitro* гомоцистеин вызывает осцилляторное увеличение внутриклеточной концентрации кальция, которое при долговременном действии может приводить к дисфункции митохондрий и вызывать гибель нейронов. Однако нейротоксический эффект гомоцистеина может быть предотвращен форсколином, что демонстрирует участие цАМФ в механизме нейропротекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31707, 14-04-00227 и 15-04-08283).

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ МЕЛАМИНА И ФЕНОЗАНА НА ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ.** © О. М. Алексеева,<sup>1</sup> Л. Д. Фаткуллина,<sup>1</sup> Т. В. Монахова,<sup>1</sup> Ю. А. Ким,<sup>2</sup> А. Н. Голоцанов.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, olgavek@yandex.ru, и <sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино.

В работе было протестировано влияние биологически активных веществ (БАВ) в широком диапазоне концентраций на функционирование пуринорецепторов и ионных каналов в клетках животного происхождения. Экранированный фенол — фенозан ( $-\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота), синтезирован в ИХФ

УЧАСТИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$  ВО ВЛИЯНИИ ГЛУТОКСИМА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ  $Ca^{2+}$  В МАКРОФАГАХ. © Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, А. А. Наумова, С. Н. Бутов, Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов. Биологический факультет С.-Петербургского государственного университета.

Синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) относится к группе лекарственных средств тиопозтинов, влияющих на процессы редокс-регуляции в клетках; используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии. Однако клеточные и молекулярные механизмы его действия далеки от полного понимания. Ранее нами впервые обнаружено, что глутоксим увеличивает внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>, вызывая мобилизацию  $Ca^{2+}$  из тапсигаргин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы. Кроме того, ранее нами показано, что в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом в макрофагах и приводящем к увеличению [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>, участвуют ферменты и (или) продукты циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты (АК). Поскольку запуск каскада метаболизма АК — одно из ключевых событий в активации макрофагов, представлялось также целесообразным исследовать участие ключевого («стартового») фермента каскада — фосфолипазы  $A_2$  (ФЛА<sub>2</sub>) — во влиянии препарата глутоксим на [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> в перитонеальных макрофагах крысы. Объектом исследования служили культивируемые резидентные перитонеальные макрофаги крысы. Для измерения [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> использовали флуоресцентный  $Ca^{2+}$ -зонд Fura-2/AM. Эксперименты проводили на 1—2-е сут после начала культивирования клеток на автоматизированной установке для измерения [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для выявления возможного участия ФЛА<sub>2</sub> во влиянии глутоксима на [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> в макрофагах был использован ингибитор ФЛА<sub>2</sub> 4-бромфенацилбромид (2,4'-дибромоацетофенон). В контрольных экспериментах показано, что 200 мкг/мл глутоксима вызывают двухфазный  $Ca^{2+}$ -ответ, связанный с мобилизацией  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо и последующим депозависимым входом  $Ca^{2+}$  в макрофаги. Впервые показано, что предварительная инкубация макрофагов с 20 мкМ 4-бромфенацилбромида в течение 15 мин до введения 200 мкг/мл глутоксима приводит к существенному подавлению как фазы мобилизации  $Ca^{2+}$  (в среднем на 47.1 %), так и последующего входа  $Ca^{2+}$  (в среднем на 79.4 %), вызываемых глутоксимом, по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют об участии ФЛА<sub>2</sub> и каскада метаболизма АК во влиянии глутоксима на [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> в макрофагах. Кроме того, результаты, полученные в этой работе и ранее, свидетельствуют о том, что препарат глутоксим, неспособный проникать через плазмалемму, вызывает в макрофагах комплексный сигнальный каскад, приводящий к увеличению [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> и активации макрофагов, одним из ключевых событий в котором является запуск каскада метаболизма АК и продукции биологически активных продуктов эйкозаноидов.

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ ПУТИ АПОПТОЗА В КРОВИ КУРЯЩИХ МУЖЧИН И ПРИ РМЖ У ЖЕНЩИН. © Е. М. Миль, А. А. Албантова, А. И. Козаченко, Л. Г. Навлер, Д. Б. Корман, Е. Б. Бурлакова. Институт биохимической физики РАН им. Н. М. Эмануэля, Москва, elenamil2004@mail.ru

Известно, что содержание белка-регулятора апоптоза p53 в крови онкологических больных увеличивается, поэтому длительное время ген p53 считался онкогеном. Однако оказалось, что в норме белок играет ключевую роль в сигнальном p53-зависимом пути репарации и апоптоза и в регуляции иммунного ответа. Было изучено содержание p53 в крови курильщиков, а также в крови пациентов, больных раком молочной железы (РМЖ), до и после лечения (Миль и др., 2005, 2012). Ранее в ряде работ было показано, что курильщики находятся в зоне наибольшего риска по частоте возникновения рака легких и дыхательных путей, поскольку под действием сигаретного дыма происходит постоянный апоптоз клеток гортани, что приводит к замещению в гене p53, появлению долгоживущего белка и изменениям в регуляции апоптоза. Нами обнаружено, что у онкологических больных курильщиков (рак верхних дыхательных путей) содержание белка p53 в сыворотке крови существенно выше и более чем в 3 раза ( $P = 0.0002$ ) превышает уровень p53 в группе здоровых. Отмечалась высокая варибельность параметра p53 в контрольной группе (0.8—3.2 отн. ед.), не коррелировавшая с интенсивностью курения. При этом уровень антиапоптозного белка bcl-2 у онкологических больных и здоровых доноров (некурящих и слабо курящих) не различался. Но у сильно курящих здоровых доноров — при постоянном апоптозе клеток гортани — уровень bcl-2, участвующего в противовоспалительном и антиоксидантном процессах, резко возрастал. Также отмечалось усиление активности антиоксидантной системы (ферментов СОД, ГП), что, вероятно, защищало их от развития онкологического процесса и могло быть связано с особенностями генотипа. При изучении содержания p53 у всех 10 больных РМЖ III—IV степени был зарегистрирован высокий уровень p53. Лечение двумя курсами химиотерапии с доксорубицином способствовало торможению опухолевого процесса за счет апоптоза клеток опухоли. У пациентов среднего возраста (36—54 года) сразу после химиотерапии в сыворотке крови отмечался рост содержания p53 (на 16—22 %), при этом индукция гена p53 дикого типа может приводить как к апоптозу, так и к репарации клеток. В пользу процессов репарации свидетельствовали изменение содержания основных иммуноглобулинов, снижение IgA и возрастание IgM и IgG, что позволяет лимфоцитам избежать апоптоза (вторичный иммунный ответ). У пациенток пожилого возраста (61—70 лет) отмечены уменьшение содержания белка p53 (17—25 %) и значительное ухудшение самочувствия. При этом у всех больных этой группы наблюдались возрастание IgM и снижение IgG и IgA (подобно первичному иммунному ответу). По-видимому, малая эффективность лечения являлась следствием возрастного снижения иммунитета и отражала дисфункцию регуляторных отношений в системах иммунной защиты и апоптоза. Лечение пожилых пациентов, по-видимому, следует сопровождать применением иммуностимуляторов и антиоксидантов. Примером препарата, вызывающего положительный антиапоптозный эффект, может служить антиоксидант фенотан, который ранее показал хороший противоопухоле-