СОДЕРЖАНИЕ

Том 37, номер 1, 2020

обзоры

_

Маркеры эндотелиальных клеток в норме и при патологии <i>Н. В. Гончаров, П. И. Попова, П. П. Авдонин, И. В. Кудрявиев</i> .	
М. К. Серебрякова, Е. А. Корф, П. В. Авдонин	3

Визуализация, свойства и функции ГАМКергических нейронов гиппокампа, содержащих проницаемые для кальция каинатные и АМРА-рецепторы	
В. П. Зинченко, С. Г. Гайдин, И. Ю. Теплов, А. М. Косенков, А. И. Сергеев, Л. П. Долгачева, С. Т. Тулеуханов	22
Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий	2.4
Н. Д. Крещенко	34
Изменение конформации резистентной и чувствительной к кардиотоническим стероидам α1-Na ⁺ ,K ⁺ -ATP-азы из почек при связывании уабаина, дигоксина и маринобуфагенина	
А. М. Тверской, В. А. Локтева, С. Н. Орлов, О. Д. Лопина	45
Изменение экспрессии генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в миокарде крысы при произвольной беговой тренировке в колесе: роль тиреоидных гормонов	
А. А. Борзых, Е. К. Селиванова, А. А. Швецова, И. В. Кузьмин, А. А. Мартьянов, А. М. Нестеренко, О. С. Тарасова	53
Роль HDAC класса IIa в экспрессии E3-лигаз ATROGIN-1/MAFbx и MuRF1 при функциональной разгрузке мыши	
С. П. Белова, Е. П. Мочалова, Т. Л. Немировская	61
Снижение токсичности цисплатина путем его конъюгации с арабиногадактаном	
Т. Н. Замай. А. К. Старков. О. С. Коловская. А. С. Кичкайло.	
Е.В. Инжеваткин, Г.С. Замай, Н.М. Титова, С.С. Замай, Ю.С. Пац	69
Правила для авторов	76

Contents

_

-

Vol. 37, No. 1, 2020

REVIEWS

Endothelial Markers in Health and Disease	
N. V. Goncharov, P. I. Popova, P. P. Avdonin, I. V. Kudryavtsev, M. K. Serebryakova, E. A. Korf, P. V. Avdonin	3

Visualization, Properties, and Functions of GABAergic Hippocampal Neurons Containing Calcium-Permeable Kainate and AMPA Receptors	
V. P. Zinchenko, S. G. Gaidin, I. Yu. Teplov, A. M. Kosenkov, A. I. Sergeev, L. P. Dolgacheva, S. T. Tuleuhanov	22
Investigation of the Physiological Role of Serotonin in Muscle Function in Planarian N. D. Kreshchenko	34
Binding of Ouabain, Digoxin, or Marinobufagenin Induces Different Conformational Changes in Kidney α1-Na ⁺ , K ⁺ -ATPase Isoforms, Resistant and Sensitive to Cardiotonic Steroids <i>A. M. Tverskoi, V. A. Lokteva, S. N. Orlov, O. D. Lopina</i>	45
Changes in the Expression of Genes Regulating Calcium Homeostasis in Rat Myocardium Induced by Voluntary Wheel Training: The Role of Thyroid Hormones	
A. A. Borzykh, E. K. Selivanova, A. A. Shvetsova, I. V. Kuzmin, A. A. Martyanov, A. M. Nesterenko, O. S. Tarasova	53
The Role of the Class IIa HDACs in the Expression of E3 ligases MuRF1 and MAFbx in Rat Soleus at the Early Stage of Muscle Unloading <i>S. P. Belova, E. P. Mochalova, T. L. Nemirovskaya</i>	61
 Reduction of the Cisplatin Toxicity by its Conjugation with Arabinogalactan T. N. Zamay, A. K. Starkov, O. S. Kolovskaya, A. S. Kichkailo, E. V. Inzhevatkin, G. S. Zamay, N. M. Titova, S. S. Zamay, Yu. S. Patc 	69
Instructions for authors	76

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 576.08,57.085.23

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© 2020 г. Н. В. Гончаров^{*a*, *b*, *, П. И. Попова^{*c*}, П. П. Авдонин^{*d*}, И. В. Кудрявцев^{*e*, *f*}, М. К. Серебрякова^{*e*}, Е. А. Корф^{*a*}, П. В. Авдонин^{*d*}}

^аИнститут эволюционной физиологии и биохимии

им. И.М. Сеченова РАН, Россия, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

^bНИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Россия, 188663, Ленинградская обл.,

Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. 93,

^сСПб ГБУЗ "Городская поликлиника № 19", Россия, 192238, Санкт-Петербург, Пражская ул., 11

^dИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

^еИнститут экспериментальной медицины, Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

^fДальневосточный федеральный университет, Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8

**e-mail: ngoncharov@gmail.com* Поступила в редакцию 28.01.2019 г. После доработки 28.03.2019 г. Принята к публикации 02.04.2019 г.

Эндотелиальные клетки (ЭК) выстилают кровеносные и лимфатические сосуды, а также камеры сердца, образуя границу между тканями, с одной стороны, и кровью или лимфой, с другой. Такое стратегическое положение эндотелия обусловливает его важнейшую функциональную роль в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза и воспалительных процессов. Повреждение эндотелия может одновременно быть и причиной, и следствием многих заболеваний. О состоянии эндотелия свидетельствует фенотип этих клеток, представленный главным образом (транс)мембранными маркерами (поверхностными антигенами). В данном обзоре дается определение эндотелияльных маркеров, приведен их перечень, рассмотрены механизмы их экспрессии и роль эндотелия в некоторых патологических состояниях.

Ключевые слова: эндотелий, маркеры, экспрессия, старение клеток, патология **DOI:** 10.31857/S0233475519040054

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелиальные клетки (ЭК) формируют своеобразный контейнер для крови, площадь которого у человека достигает 6000 м² [1]. Это уникальная диффузная ткань, суммарный вес которой равен примерно 700 г, а большая часть (примерно 600 г) образует стенки капилляров [2]. Микрососуды головного мозга составляют 3–4% его объема, их совокупная длина близка к 700 км, а поверхность обмена между кровью и паренхи-

Список сокращений: АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, АФК – активные формы кислорода, Аβ – амилоид-β₁₋₄₀, ГГТ – γ-глутамилтранспептидаза, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, МАО – моноаминоксидаза, РАС – ренин-ангиотензиновая система, ЦНС – центральная нервная система, ЭК – эндотелиальные клетки, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Апg – ангиотензин, Angpt – ангиопоэтин, BMP-7 – костный морфогенетический белок 7, САМ – молекулы клеточной адгезии, Cavl – кавеолин-1, ECFC – эндотелиальные колониеобразующие клетки, EGF – эндотелиальный фактор роста, EndoMT – эндотелиально-мезенхимальный переход, EPC – эндотелиальные прогениторы, ESAM – эндотелиальная селективная молекула адгезии, ESDN – нейропилин-подобный белок, синтезируемый эндотелиальными и гладкомышечными клетками, ET-1 – эндотелии 1, FAT – транслоказа жирных кислот, FGF – фактор роста фибробластов, GSK – киназа гликогенсинтазы, HIF – фактор, индуцируемый гипоксией, HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека, ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии.1, Ig – иммуноглобулин, KTS – синдром Клиппеля– Треноне, MCAM – молекула адгезии клеток меланомы, MHC I – главный комплекс гистосовместимости I класса, mTOR – минопротеины низкой плотности, OP-1 – остеогенный белок-1, PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, PECAM – молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, PKC – протеинкиназа С, PRR – паттерн-распознающие рецепторы, PTK – протеин-тирозин-киназа, TEM – опухолевый эндотелиальный маркер, TGF-β – трансформирующий фактор роста β, TM – тромбомодулин, TNAP – тканевая неспецифическая щелочная фосфатаза, TNF – фактор роста эндотелиальный кактор роста внабоводии, WPB – тельца Вейбеля – Трансформирующий фактор роста внабоводили, tNAP – тканевая неспецифическая щелочная фосфатаза, TNF – фактор реста внабоводии, WB – тельца Вейбеля – Трансформирующий фактор роста внаботели сосудов, VWF – фактор Виллебранда, WPB – тельца Вейбеля – Трансформириски в сосудов, VWF – фактор

мой головного мозга – около 20 м² [3]. ЭК происходят из мезодермы на ранних стадиях гаструляции. Ювенильные ЭК формируют первичное сосудистое сплетение и дифференцируются в артериальные, венозные, лимфатические и капиллярные ЭК (эмбриональный васкулогенез). Образование кровеносных сосудов de novo имеет место и после рождения за счет эндотелиальных прогениторов (ЕРС) костного мозга (постнатальный васкулогенез). Однако более известным механизмом формирования новых кровеносных сосудов после рождения организма является ангиогенез, когда новые ЭК образуются в результате пролиферации уже имеющихся ЭК с той или иной степенью специализации. Дифференцировка и функциональная специализация ЭК – один из важнейших факторов специализации того или иного органа в целом. Например, в сердце можно обнаружить пять различных типов ЭК: эндокардиальный, ЭК коронарных артерий, венозный, капиллярный и лимфатический: кажлый из них имеет соответствующий фенотип [4]. Обмен питательными веществами и регуляторными молекулами, а также газообмен происходят в капиллярах, где соотношение между поверхностью эндотелия и объемом крови в 100-500 раз больше, чем в артериях и венах [5, 6]. Собственно сосудистые и тканеспецифические функции ЭК обусловлены особенностями паренхиматозных и гладкомышечных клеток, оксигенацией крови, скоростью и интенсивностью кровотока. Наиболее известными морфологическими фенотипами эндотелия являются непрерывный (гематоэнцефалический барьер), фенестрированный (экзокринные и эндокринные железы, слизистая оболочка желудка и кишечника, сосудистое сплетение, клубочки и субпопуляция почечных канальцев), синусоидальный, или прерывистый (печень, селезенка, костный мозг) [7]. ЭК гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) образуют непрерывный слой с плотными контактами между клетками, лишены фенестр, что существенно ограничивает пара- и трансцеллюлярный обмен молекул [8]. Кроме того, ЭК ГЭБ имеют низкую экспрессию молекул адгезии лейкоцитов, что делает практически невозможным проникновение иммунных клеток в здоровую ЦНС [9]. Среди характерных маркеров ГЭБ – тканенеспецифическая шелочная фосфатаза, благодаря которой ЭК капилляров головного мозга отличаются от ЭК капилляров других органов [3]. Экспрессия ү-глутамилтранспептидазы (ГГТ) и моноаминоксидазы (МАО) также характерна для ЭК микрососудов головного мозга [10, 11]. Напротив, тромбомодулин практически отсутствует в ЭК головного мозга, в то время как в других ЭК его экспрессия отчетливо выражена [5]. Во многих тканях за пределами ГЭБ перенос макромолекул через эндотелий (трансцитоз) опосредован кавеолами, везикуло-

вакуолярными органеллами и трансэндотелиальными каналами. Плотность кавеол в эндотелии капилляров может достигать 10000 на клетку, что значительно больше, чем в артериях, артериолах, венах или венулах [12]. Транспорт низкомолекулярных веществ происходит между клетками (парацеллюлярный путь). Эндоцитоз крупных молекул наиболее выражен в эндотелии синусов печени, в этом процессе участвуют участки мембраны, покрытые со стороны цитоплазмы клатрином, полимеризация которого приводит к формированию везикулы [7]. ЭК костного мозга экспрессируют Е-селектин (CD62E) конститутивно, тогда как в других типах ЭК Е-селектин экспрессируется только при воспалении. Реакшия на воспалительные шитокины и вазоактивные агенты существенно варьирует, но, как правило, реакция посткапиллярных венул более выражена. Экспрессия ангиотензин-превращаюшего фермента (АП Φ) выражена в ЭК мелких артерий и артериол во всех органах, за исключением почек, в то время как ЭК крупных артерий и вен слабо или совсем не экспрессируют АПФ [13].

Здоровый эндотелий характеризуется сосудорасширяющим фенотипом с высоким содержанием оксида азота (NO) и простациклина (PGI2), а также низким содержанием мочевой кислоты и активных форм кислорода (АФК). С другой стороны, ЭК вовлечены в этиологию таких распространенных заболеваний человека, как инсульт, диабет, инсулинорезистентность, болезни сердца, периферических сосудов, опухолевый рост и метастазирование, хроническая почечная недостаточность, ревматоидный артрит и вирусные инфекции [14]. В обычном неактивированном состоянии ЭК экспрессируют молекулы МНС І (главного комплекса гистосовместимости класса I) и PRR (паттерн-распознающие рецепторы) для обнаружения РАМР (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны). Воспалительные стимулы инициируют переход ЭК в провоспалительное и прокоагулянтное состояние. В ответ на воспалительные стимулы ЭК экспрессируют молекулы МНС II, презентирующие эндотелиальные антигены иммунным клеткам [15]. Описано также увеличение экспрессии других эндотелиальных маркеров и молекул клеточной адгезии (САМ) после воздействия АФК или провоспалительных стимулов [16, 17]. В больших количествах АФК оказывают негативное влияние на эндотелиальные и другие клетки, тогда как низкие концентрации АФК обладают сигнальными функциями и непрерывно генерируются клетками. Дисбаланс в генерации и нейтрализации АФК обусловливает ремоделирование (преобразование) сосудов. Источниками АФК в эндотелиальных и/или соседних клетках являются NADPHоксидазы, митохондрии, ксантиноксидазы, NO-синтазы, цитохром Р450, липоксигеназы,

циклооксигеназы, пероксидазы, МАО и гемоглобин эритроцитов [18–20].

Несмотря на многочисленные исследования, мы далеки от понимания закономерностей экс-прессии эндотелиальных маркеров как в норме, так и при различных патологических состояниях организма.

КАКИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ МОЖНО СЧИТАТЬ ГЛАВНЫМИ, А КАКИЕ ВТОРОСТЕПЕННЫМИ?

Белковые молекулы, экспрессируемые на поверхности клеток, часто служат маркерами определенных типов, популяций или субпопуляций клеток. Морфологические и ультраструктурные особенности также не потеряли своей значимости, хотя еще не так лавно они были елинственными признаками, по которым можно было судить о типе клеток, ну а некоторые клетки до сих пор не нуждаются в особых молекулярных маркерах для своей идентификации (например, эритроциты). Что касается ЭК, то фактор Виллебранда (VWF), наряду с тельцами Вейбеля-Палада (WPB), АПФ (CD143) и морфологией "булыжной мостовой", специфичной для монослойных культур, долгое время (примерно четверть века, начиная с 1970-х годов), служили обязательными критериями идентификации и подтверждения чистоты культуры ЭК [21, 22]. Современный (хотя и не исчерпывающий) список эндотелиальных маркеров с их характеристиками приведен в табл. 1. Тем не менее, ставшие "классическими" эндотелиальные маркеры по-прежнему являются объектом многочисленных исследований.

ГЛАВНЫЕ МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИЯ

Тельца Вейбеля-Паладе (WPB) представляют собой специфические для эндотелия секреторные органеллы. В них содержатся VWF, Р-селектин (CD62P) и ангиопоэтин-2 (Angpt2), участвующие в связывании тромбоцитов, рекрутировании лейкоцитов и модуляции воспаления, соответственно [59]. VWF является важным компонентом гемостаза, связывая тромбоциты в местах повреждения эндотелия; он продуцируется в мегакариоцитах и ЭК [60]. VWF обнаружен примерно в 80% популяции клеток в культуре HUVEC [17]. На поверхности ЭК мультимеры VWF разрезаются на более короткие с помощью металлопротеазы ADAMTS-13, которая связывается с доменами VWF-АЗ и разрезает отдельные молекулы VWF в сайте Tyr1605-Met1606 внутри доменов VWF-A2 [61]. Это приводит к поступлению в кровоток более мелких и более округлых мультимеров, длина которых в вытянутом состоянии достигает 20 мкм. Сайты связывания и расщепления для ADAMTS-13 скрыты в их округлой структуре, но становятся доступными при повышенном напряжении сдвига (shear-stress) [62]. Эндотелиальный VWF может участвовать в ангиогенезе. Ингибирование экспрессии микроРНК VWF в ЭК обусловливает усиление ангиогенеза in vitro и повышенную VEGFR-2-зависимую пролиферацию и миграцию в сочетании со снижением уровней интегрина-αуβ3 и повышенным высвобождением ангиопоэтина-2; кроме того, у мышей с дефицитом VWF отмечена повышенная васкуляризация [58]. Потеря VWF в ЭК приводит к усиленному и дисфункциональному ангиогенезу, это согласуется с клиническими наблюдениями, согласно которым у некоторых пациентов с болезнью Виллебранда пороки развития сосудов могут вызывать сильное желудочнокишечное кровотечение [63].

АПФ (КФ 3.4.15.1), один из основных компонентов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), представляет собой С-концевую дипептидилкарбоксипептидазу I, превращающую ангиотензин I в вазоконстрикторный ангиотензин II и расщепляющую брадикинин [64], а также белок бета-амилоида [65]. У человека в среднем около 20% капиллярных ЭК в каждом органе экспрессируют АПФ, исключение составляют легкие и почки. Так, в легких человека все капиллярные ЭК экспрессируют АПФ, тогда как во всей сосудистой сети почек АПФ отсутствует. У крыс, в отличие от человека, гомогенная эндотелиальная экспрессия АПФ наблюдается в артериях и венах всех органов, но в сосудах почек выявлена низкая экспрессия АПФ. Снижение экспрессии АПФ в сосудистой сети почек может защитить почечную циркуляцию от избыточного образования ангиотензина II и истощения кининов, что позволяет поддерживать почечный кровоток [13]. АПФ2 является относительно новым компонентом РАС. Он известен с 2003 года, когда выяснили, что $A\Pi \Phi 2$ является рецептором коронавируса SARS, и нормальный уровень АПФ2 в легких необходим для борьбы с воспалительными заболеваниями легких [66]. Активные пептиды РАС – это ангиотензин II (Ang II), Ang III, Ang IV и Ang(1-7), cpeди которых Ang II и Ang(1-7) представляются наиболее важными с точки зрения подержания нормальных физиологичских функций и патогенеза [67]. Функциональные эффекты Ang(1-7) сильно отличаются от таковых при стимуляции рецептора АТ(1): это вазодилатация, натрийурез, ингибирование пролиферации, повышение активности системы брадикинин-NO (оксид азота). Каталитическая эффективность АПФ2 примерно в 400 раз выше с Ang II в качестве субстрата, чем с Ang I [68]. Продукт протеолиза Ang(1-7) действует на особый рецептор – онкоген Mas [69], так что ось ACE2/Ang(1-7)/ Mas можно рассматривать как систему противовеса оси $A\Pi \Phi / AngII / AT(1)$. Этот сигнальный путь включает фосфорилирова-

Таблица 1	1.	Маркеры эндотелиальных клеток	(модифицировано по	[23]	D
-----------	----	-------------------------------	--------------------	------	---

Эндотелиальный маркер	Функция
CD13/APN	CD13/аминопептидаза N — трансмембранная пептидаза, которая индуцируется в сосудистой сети солидных опухолей и является мощным ангиогенным регулято- ром. CD13 функционирует как модулятор передачи сигнала и подвижности клеток благодаря влиянию на специфическую организацию плазматической мембраны, регулируя таким образом ангиогенез [24]
CD29/интегрин β1	Интегрин β1 участвует в ангиогенезе, контролируя ветвление прорастающих капилляров, но при этом тормозит пролиферацию ЭК. В формирующихся сосудах интегрин β1 необходим для правильной локализации VE-кадгерина и целостности межклеточных контактов [25]. Кроме того, интегрин β1 необходим для взаимодействия между кардиомиоцитами и ЭК [26]
CD31/PECAM-1	CD31, известный как PECAM-1 (молекула адгезии тромбоцитов и ЭК 1), является гликозилированным трансмембранным гомофильным белком адгезии, который в значительном количестве экспрессируется в ЭК и необходим для миграции лейкоцитов, играя ключевую роль в удалении старых нейтрофилов. Внеклеточный домен CD31 высвобождается при апоптозе ЭК, его можно обнаружить в сыворотке пациентов, перенесших инфаркт миокарда, острый ишемический инсульт и у больных рассеянным склерозом [27]
CD34	CD34 — трансмембранный фосфогликопротеин, впервые обнаруженный на гемопо- этических стволовых и прогениторных клетках. Клетки, экспрессирующие CD34, в норме имеются в пуповине и костном мозге: это гемопоэтические клетки, субпо- пуляция мезенхимальных стволовых клеток, эндотелиальные прогениторы (EPC). CD34 могут экспрессировать ЭК кровеносных сосудов и лимфатических сосудов плевры. Присутствие CD34 на негемопоэтических клетках обусловлено общностью фенотипа прогениторов и стволовых клеток взрослого организма [28]
CD36/SR-B3	СD36 известен как рецептор-"мусорщик" 3В класса (SR-B3), гликопротеин IV мем- браны тромбоцитов (GPIV), гликопротеин IIIb (GPIIIb), рецептор тромбоспондина, рецептор коллагена, транслоказа жирных кислот (FAT) и даже как рецептор врожденного иммунитета. При связывании лиганда CD36 запускает сигнальный каскад, который опосредует широкий спектр провоспалительных ответов. Например, амилоид-β ₁₋₄₀ (Aβ), взаимодействуя с CD36, активирует образование супероксид-анионов NADPH-оксидазой [29]
CD39/ENTPD1	CD39 (ENTPD1) — это эктонуклеотидаза, экспрессия которой ярко выражена на поверхности ЭК, но также имеется на поверхности тромбоцитов и лейкоцитов. CD39 катализирует внеклеточный гидролиз АТР до ADP и AMP. Молекулы CD39 высвобождаются из эндотелия коронарных сосудов при ишемии—реперфузии, так что уровень циркулирующей эктонуклеотидазы отражает степень ишемического повреждения сосудов [30]. Снижение или отсутствие активности CD39 связано с сосудистой дисфункцией и ремоделированием при легочной артериальной гипертензии [31], а также при пониженной регенерации печени [32]
CD44	Экспрессия CD44 в колониеобразующих ЭК (ECFC) связана с регуляцией нейро- васкулярного трофического эффекта [33]. ЕСFC это зрелые EPC, готовые к диффе- ренцировке и восстановлению популяции ЭК. Они находятся в сосудистом русле и могут мигрировать в места повреждения в виде циркулирующих ЭК [34]
CD47	CD47 — иммуноглобулин, который функционально сопряжен с ICAM-1 (CD54), участвуя во внутриклеточной мобилизации кальция, активации киназ Src и AKT1/PI3K, повышении проницаемости микрососудов мозга для трансэндотелиальной миграции Т-клеток и диапедеза других клеток крови [35]

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Эндотелиальный маркер	Функция
CD54/ICAM-1	ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии-1) — это трансмембранный белок, экспрессия которого повышается на эндотелиальных и эпителиальных клетках в местах воспаления. ICAM-1 опосредует адгезию и парацеллюлярную миграцию лейкоцитов, экспрессирующих LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18). Растворимый ICAM-1 участвует в ангиогенезе и является индикатором активации или повреждения ЭК. Повышенный уровень растворимого (циркулирующего в крови) ICAM-1 сопряжен с оксидативным стрессом, гипертонией, сердечно-сосу- дистыми заболеваниями, сахарным диабетом 2-го типа, дисфункцией транспланта- тов, увеличением массы абдоминального жира, заболеваниями печени, некоторыми злокачественными новообразованиями и сепсисом [36]
СD61/интегрин β3	CD61 (интегрин-β3) – белок, участвующий в агрегации тромбоцитов. Он считался маркером только этих клеток, но затем был выявлен на поверхности ЭК, где он сопряжен с другими белками, в частности с дисульфидизомеразой [37]
CD62E/Е-селектин	Е-селектин (молекула адгезии-1 ЭК-лейкоцитов, ELAM-1, CD62E) – одна из трех в семействе селектинов (Е-селектин, L-селектин и P-селектин), который транзитно экспрессирован на ЭК в ответ на IL-1β и TNF-α
CD80/B7-1 CD86/B7-2	В определенных условиях ЭК являются антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими молекулы МНС как класса I, так и класса II [15]. Например, ЭК печеночных синусов экспрессируют молекулы адгезии CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) в ответ на ишемию/реперфузию печени крысы; экспрессия CD80, CD86 и ICAM-1 также повышается в клубочковых и перитубулярных ЭК после ишемии/реперфузии [38]
CD93/C1qR1	C1qR1 (или C1qRp), коллектин (представитель семейства растворимых паттерн-распознающих рецепторов (PRR)), антиген AA4. Это трансмембранный гликопротеин типа I, обнаруживаемый не только на ЭК, но и на гемопоэтических клетках-предшественниках, тромбоцитах и клетках миелоидного происхождения. Молекулы C1qR1 опосредуют повышенный фагоцитоз моноцитами и макрофагами при взаимодействии с растворимыми защитными коллагенами, такими как C1q, MBL и SP-A
CD102/ICAM-2	Молекулы ICAM-2 конститутивно экспрессированы в ЭК сосудов и лимфогемопоэтических клетках. Они участвуют в агрегации Т-клеток, цитотоксичности и миграции NK-клеток
CD105/эндоглин	Эндоглин — трансмембранный рецептор типа III лигандов суперсемейства TGF-β, который играет важную роль в дифференцировке гладкомышечных клеток, ангиоге- незе и неоваскуляризации. Его экспрессия ярко выражена на пролиферирующих ЭК сосудов, хондроцитах и синцитиотрофобластах плаценты. Повышенный уровень антиангиогенного эндоглина, циркулирующего в крови, является патогенным маркером при преэклампсии
CD106/VCAM-1	Молекула адгезии 1 клеток сосудов участвует в адгезии иммунных клеток к ЭК сосу- дов при воспалении. Взаимодействует с интегринами-α4/β1 (VLA-4), α4/β7, α9/β1 и αD/β2. VCAM-1 конститутивно экспрессирована в костном мозге, где регулирует миграцию Т- и В-клеток и гемопоэтических прогениторов. Растворимая форма VCAM-1 способствует хемотаксису моноцитов
CD112/нектин-2	Нектины — это трансмембранные гликопротеины типа I, которые являются каль- ций-независимыми Ig-подобными молекулами адгезии. Нектин-1 (CD111, PRR1, медиатор проникновения вируса герпеса С или HVEC), нектин-2 (CD112, PRR2 и HVEB) и нектин-3 (PRR3) выявлены в адгезивных контактах ЭК, нейронов, эпителиальных клеток и фибробластов

ГОНЧАРОВ и др.

Эндотелиальный маркер	Функция
CD117/c-Kit	CD117/c-Kit — это рецептор с тирозинкиназной активностью, который связывает фактор стволовых клеток; CD117/c-Kit является маркером некоторых типов гемопо- этических предшественников в костном мозге (гемопоэтические стволовые клетки, мультипотентные прогениторы и общие миелоидные прогениторы). Его экспрессия считается отличительной чертой гемогенных ЭК [39]
CD121a/IL-1 RI	IL-1RI, также известный как рецептор типа 1 IL-1 и CD121a, является трансмем- бранным белком суперсемейства Toll/IL-1R (TIR). IL-1RI связывает плейотропные цитокины IL-1α и IL-1β, а также антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra). IL-1RI экс- прессируется главным образом Т-клетками, фибробластами и ЭК, его активация через NF-кВ опосредует острую фазу воспалительных реакций
СD133/проминин-1	СD133, или проминин-1 — гликопротеин, представитель пентаспановых трансмем- бранных гликопротеинов, который локализуется в выступах (протрузиях) клеток. CD133 экспрессирован в гемопоэтических стволовых клетках, EPC, клетках глиоб- ластомы и во многих других типах клеток [40]. Хотя точная функция CD133 неиз- вестна, предполагается, что он действует в качестве организатора топологии клеточной мембраны. В ЕСFC клетках CD133 экспрессирован внутриклеточно и участвует в васкулогенезе [41]. Так, в крови пациентов, перенесших инсульт, повышен уровень стволовых клеток (CD133+) и ранних EPC (CD133+CD309+), наряду с повышенным уровнем EGF и фибробластов, однако воспалительные процессы обуславливают снижение уровня ангиогенных факторов и EPC [42]
СD141/тромбомодулин/ BDCA-3	Тромбомодулин (TM, CD141, BDCA3) — это трансмембранный белок, экспрессирующийся на ЭК, гладкомышечных клетках артерий, моноцитах и макрофагах. Он связывает тромбин и усиливает опосредованную тромбином активацию антикоа- гулянтного белка С и антифибринолитической TAFI/карбоксипептидазы B2. Тромбомодулин также подавляет способность тромбина активировать ряд прокоагулянтных белков, таких как фибриноген, факторы V и XIII, PAR-1. Уровень растворимых фрагментов тромбомодулина повышен в сыворотке, моче и синовиальной жидкости при нарушениях гемостаза и воспалительных процессах
CD142/фактор свертыва- ния крови III/ тканевый фактор/ тромбопластин	Тканевый фактор представляет собой интегральный мембранный белок, экспрессируемый многими типами клеток, в том числе ЭК. Он служит кофактором/рецептором фактора свертывания крови VII
СD143/АПФ	АПФ и АПФ2 — протеазы клеточной поверхности, регулирующие гомеостаз артериального давления и водно-солевой баланс, главным образом, благодаря образованию ангиотензина II и инактивации брадикинина. Кроме того, активность АПФ играет роль в иммунном статусе, репродукции, регуляции активности нейропептидов
CD144/VE-кадгерин	Эндотелиальный кадгерин — это специфическая молекула адгезии, расположенная исключительно в местах соединения между ЭК. Адгезия ЭК с участием VE-кадгерина обеспечивает контроль проницаемости сосудов и экстравазацию лейкоцитов. Кроме того, VE-кадгерин участвует в пролиферации клеток, апоптозе и модулирует функции рецепторов EGF [43]
CD146/MCAM	CD146 известен также как молекула адгезии клеток меланомы (MCAM) и гликопротеин клеточной поверхности MUC18. CD146 служит маркером ЭК, в том числе десквамированных. MCAM является рецептором ламинина-α4, молекулы внеклеточного матрикса сосудистой стенки. MCAM также экспрессиру- ются гладкомышечными клетками и перицитами. Подавление MCAM ускоряет старение мезенхимальных стволовых клеток пуповинной крови человека [44]. Кроме того, MCAM является неблагоприятным прогностическим фактором при саркоме матки [45]

МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Эндотелиальный маркер	Функция
CD147/TRA-1-85	Антиген TRA-1-85, или антиген группы крови Oka, считается специфическим эпитопом белка базигина, известного как EMMPRIN и CD147. Это детерминанта клеточной поверхности, экспрессируемая практически всеми клетками человека
CD151	CD151 представляет собой гликопротеин суперсемейства тетраспанинов, экспресси- руемый ЭК, эпителиальными клетками, мегакариоцитами и тромбоцитами. Он взаимодействует с другими тетраспанинами и интегринами, такими как α3/β1, α6/β1, α6/β4 и α7/β1. CD151 участвует в клеточной адгезии, миграции и активации тромбоцитов
CD160	CD160 представляет собой заякоренный гликопротеин с одним Ig-подобным доменом типа V, обнаруженный, в основном, в субпопуляции цитолитических T-клеток и натуральных киллеров, где служит рецептором для MHC класса I и родственных молекул. Экспрессируемый на ЭК CD160 участвует в передаче антиангиогенных сигналов и апоптотической гибели клеток
CD201/EPCR	ЕРСК (эндотелиальный рецептор белка С) – трансмембранный гликопротеин, экспрессируемый на ЭК. ЕРСК ингибирует тромбоз, взаимодействуя с белком С, активированным белком С (аРС) и факторами свертывания крови VII и VIIa. ЕРСК усиливает активацию белка С при взаимодействии с комплексами тромбин-тром- бомодулин. Растворимая форма ЕРСК подавляет антикоагулянтную активность аРС. ЕРСК связывается с CD11b/CD18 (Mac-1) на моноцитах, опосредуя адгезию моноцитов к эндотелию сосудов
CD213a/IL-13R alpha 1	Два члена подсемейства 5 рецепторов цитокинов типа I служат также рецепторами IL-13, которые связываются с IL-13Rα1 (CD213a1, известный, как IL13Ra или NR4) с низким сродством, а затем взаимодействуют с α-цепью IL-4R, образуя высокоаффинный рецептор, способный активировать STAT6. Кроме того, IL-13 может высокоаффинно взаимодействовать с IL-13Rα2 (CD213a2) без активации STAT6, но продуцируя TGF-β
CD248/эндосиалин	Эндосиалин, или эндотелиальный маркер опухолей 1 (Tem1), представляет собой трансмембранный О-гликозилированный белок 165 кДа, который содержит один лектин С-типа, один Суши-домен, один EGF-подобный домен и муциноподобную ножку во внеклеточном домене (ECD). Он экспрессируется на активированных периваскулярных и стромальных клетках в эмбриональных и опухолевых сосудах, но экспрессия подавлена в зрелой сосудистой сети. Эндосиалин регулирует пролиферацию, миграцию и адгезию перицитов к матриксному фибронектину и коллагенам I и IV
CD309/VEGFR2/ KDR/ Flk-1	VEGFR2 (рецептор типа 2 EGF) — это трансмембранная рецепторная тирозинки- наза, которая опосредует ангиогенное действие VEGF-A и VEGF-C. Он экспресси- рован главным образом на ЭК сосудов и ЕРС, но также в гемопоэтических стволовых клетках, эпителии эндометрия, клетках печеночных синусов и многих других клетках. Усиление экспрессии CD309 приводит к увеличению проницаемости эндотелия в микрососудистом русле [46]
ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 33	Металлопротеазы ADAM10 и ADAM17 с дизинтегриновым доменом служат основ- ными регуляторами цитокинов, факторов роста и молекул адгезии за счет протеоли- тического шеддинга [46]. ADAM 12 и 17, экспрессируемые в ЭК, ответственны за нарушение гематоневрального барьера в условиях гипоксии. Вероятно, это проис- ходит в результате протеолиза клаудина-5, одной из молекул плотных контактов ЭК, так как ингибирование металлопротеаз ADAM <i>in vivo</i> восстанавливает нарушенную барьерную функцию [47]

ГОНЧАРОВ и др.

Эндотелиальный маркер	Функция
ADAMTS-13	АDAMTS-13 (дизинтегрин-подобная металлопротеаза с повторами-13 тромбоспон- дина типа 1) — цинксодержащая металлопротеаза, которая расщепляет фактор Виллебранда. ADAMTS-13 синтезируется в ЭК и звездчатых клетках печени, присутствует в тромбоцитах. Кроме того, ADAMTS-13 синтезируется в подоцитах почек с последующим отложением в базальной мембране клубочков (гломерул), что предотвращает образование тромбов. ЭК вносят основной вклад в синтез ADAMTS-13 в организме [5]
ADAMTS-18	ADAMTS-18 входит в особое семейство протеаз — дизинтегринов и металлопротеаз с мотивами тромбоспондина, участвующих в ангиогенезе и тромбообразовании. Нарушение регуляции или мутации этих ферментов приводит к воспалению, раку, артриту, атеросклерозу и другим заболеваниям. Секреция ADAMTS-18 ЭК усиливается тромбином. Агрегаты тромбоцитов могут быть разрушены С-концевым фрагментом ADAMTS-18 [48]
CXCL16	Трансмембранный СХС-хемокиновый лиганд 16. Эриптозные эритроциты прикрепляются к ЭК сосудистой стенки, в частности, благодаря взаимодействию фосфатидилсерина, экспонированного на поверхности эритроцитов, с эндотелиальным СХСL16 [49]
DCBLD2/ESDN	DCBLD2 (дискоидин, CUB и LCCL-домен-содержащий белок 2), также известный как ESDN (нейропилин-подобный белок, синтезируемый ЭК и гладкомышечными клетками) и CLCP1. DCBLD2 имеет структурное сходство с нейропилинами, рецепторами VEGF и семафоринами, он участвует в передвижении клеток и метастазировании
Эндомуцин	Эндомуцин (эндотелиальный сиаломуцин; также эндомуцин-1/2 и муцин-14) — гликопротеин 80—120 кДа, представитель семейства белков-эндомуцинов. Экспрессируется на ЭК и функционирует как про- или антиадгезивная молекула, в зависимости от характера гликозилирования
ESAM	ESAM (эндотелиальная селективная молекула адгезии) — ассоциированный с ЭК представитель подгруппы суперсемейства СТХ иммуноглобулинов. Эта молекула ассоциирована с плотными и адгезионными контактами, а также модулирует транс- эндотелиальную миграцию клеток, наряду с FGF-2
FABP	Белки, связывающие жирные кислоты (FABP), — небольшие цитоплазматические белки, которые могут связывать свободные жирные кислоты, холестерин и ретино- иды, участвуя в их внутриклеточном транспорте. Наряду с другими биомаркерами, циркулирующие FABP служат индикаторами повреждения тканей. В частности, гипоксия влияет на экспрессию FABP в ЭК [50]
IgG (иммуноглобулин G)	Под воздействием внешних IgG в клетках эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) активируется синтез и секреция FcRn и собственных IgG [50]
Интегрин-α4β1/VLA-4	Интегрин-α4β1 (VLA-4) и VCAM-1 обеспечивают межклеточную адгезию между ЭК и перицитами. Интегрин-α4β1 экспрессируется пролиферирующими ЭК, а VCAM-1 – пролиферирующими муральными клетками. Антагонисты этого взаимодействия блокируют адгезию муральных клеток к пролиферирующим ЭК, вызывая тем самым апоптоз ЭК и перицитов и ингибируя неоваскуляризацию [51]
KLF4	Крюппель-подобный фактор 4 (KLF4) — это транскрипционный фактор и централь- ный регулятор ангиогенеза через сигнальный путь Notch [52]. Эндотелиальный KLF4 является ренопротективным, он обеспечивает статин-индуцированную защиту от ишемического острого повреждения почек (ОПП) путем регуляции экспрессии молекул клеточной адгезии (САМ) и сопутствующего рекрутирования воспалительных клеток [53]

Эндотелиальный маркер	Функция
LYVE-1	Рецептор-1 гиалуронана эндотелия лимфатических сосудов (LYVE-1) — это транс- мембранный гликопротеин типа I с мол. массой 60 кДа, представитель суперсемей- ства связывающих белков. Гиалуронан обнаружен во внеклеточном матриксе большинства тканей животных и в биологических жидкостях. LYVE-1 модулирует поведение клеток во время развития, ремоделирования тканей и при разных заболе- ваниях, он является маркером лимфатических ЭК, а также экспрессируется на ЭК синусов печени. В меньшей степени LYVE-1 экспрессирован на клетках Купфера, островках Лангерганса, корковых нейронах и почечном эпителии
Notch	Notch-сигналинг является эволюционно консервативным механизмом, имеющим важнейшее значение для развития сердечно-сосудистой системы. Вклад Notch-сиг- налинга в гомеостаз сосудистой системы отражен в новой парадигме, согласно кото- рой этот путь чувствителен к факторам окружающей среды, медиаторам воспаления, компонентам питания [54]
Подокаликсин	Подокаликсин, также известный как подокаликсин-подобный белок 1/PODXL, или PCLP1 является сиалогликопротеином, структурно связанным с CD34. Экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках, а также служит маркером гемангиобластов, общих предшественников кроветворных и ЭК
Подопланин	Подопланин, также известный как T1α и Aggrus, является трансмембранным глико- протеином муцинового типа с выраженным О-гликозилированием. Экспрессиру- ется лимфатическими ЭК, а также не ЭК в некоторых тканях. Подопланин участвует в регуляции образования лимфатических сосудов и агрегации тромбоцитов
RLIP76/RALBP1	RLIP76 (Ral-взаимодействующий белок 76 кДа), известный также как RalBP1 (Ral-связывающий белок 1) — это ATP-зависимый транспортер конъюгатов электрофил-глутатион [55]
Стабилин-1 и -2	Стабилин-1 и -2 — трансмембранные представители типа I семейства гомологов рецептора фасциклиноподобного гиалуронана, экспрессируемые на синусоидальных ЭК и макрофагах. Стабилин-1 участвует в избавлении от собственных нежелательных молекул, тогда как стабилин-2 — это скавенджер-рецептор для гиалуронана и гликированных белков
TEM8/ANTXR1	Опухолевый эндотелиальный маркер 8 (ТЕМ8) является одним из восьми предста- вителей семейства ТЕМ, которые функционально связаны с опухолевым ангиогене- зом. ТЕМ8 и СМG2 (ген 2 морфогенеза капилляров) представляют собой трансмембранные белки типа I с внеклеточным доменом A VWF. Они считаются представителями семейства рецепторов токсина сибирской язвы. ТЕМ8 экспресси- рован на высоком уровне в сосудистой сети солидных опухолей и может функцио- нировать в качестве молекулы адгезии при капиллярном тубулогенезе
THSD1	THSD1 (белок 1, содержащий домен тромбоспондина типа 1), также известный как трансмембранная молекула с тромбоспондиновым модулем (Tmtsp), — трансмембранный белок типа I, 95 кДа. Он сильно экспрессирован в гемопоэтических стволовых клетках и прогениторах. Кроме того, THSD1 широко представлен на ЭК, особенно в легких. THSD1 участвует в регуляции васкулогенеза и/или ангиогенеза
Tie-1 и Tie-2	Tie-1/Tie и Tie-2/Tek являются рецепторными тирозинкиназами с уникальными структурными характеристиками: двумя иммуноглобулин-подобными доменами, фланкирующими три EGF-подобных домена, за которыми следуют три фибронектин-подобных повтора типа III во внеклеточной области, а также расщепленный тирозинкиназный домен в цитоплазме. Рецептор Tie-2 является важным регулятором барьерной функции эндотелия. Основные лиганды Tie-2, ангиопоэтины 1 и 2, оказывают противоположное действие на этот рецептор в условиях воспаления [56]

ГОНЧАРОВ и др.

Таблица 1. Окончание

Эндотелиальный маркер	Функция
TNAP	Тканевая неспецифическая щелочная фосфатаза (TNAP) локализуется в мембранах ЭК кровеносных сосудов головного мозга и в мембранах нейронов, где она индуци- рует нейрональную токсичность посредством тау-дефосфорилирования. Эта функ- ция вовлечена в потерю нейронов, наблюдаемую при болезни Альцгеймера. Уровень TNAP повышается в плазме крови при цереброваскулярных заболеваниях и после травмы головного мозга [3, 57]
TNF RII/TNFRSF1B	TNFRII (рецептор II фактора некроза опухоли), также известный как TNFRSF1B, p75/p80 и CD120b — это один из широко представленных рецепторов TNF-α и лим- фотоксина-α. Его активация может инициировать воспаление и выживание ЭК через NF-кB-зависимые сигнальные пути, но также может индуцировать апоптоз
VE-statin	VE-статин — секретируемый гликопротеин с мол. массой. 41 кДа, представитель довольно большого семейства белков, содержащих EGF-подобные домены. VE-статин — маркер эмбриональных ЭК, но также экспрессирован в ЭК взрослого организма; его секреция блокирует миграцию гладкомышечных клеток
VG5Q	Экспрессия белка VG5Q, или AGGF1, связана с синдромом Клиппеля–Треноне (KTS), врожденной патологии морфогенеза сосудов. VG5Q экспрессируется в ЭК сосудов многих тканей, его секреция способствует пролиферации соседних ЭК
VWF	VWF — это гликопротеин, участвующий в свертывании крови, он опосредует при- крепление тромбоцитов к поврежденным ЭК. VWF высвобождается из телец WPB, имеет сайты связывания для фактора VIII и гепарина. Размер и функция VWF регулируются протеазой ADAMTS-13. Нарушение этой функции может привести, в частности, к тромботической тромбоцитопенической пурпуре. Также VWF участвует в регуляции ангиогенеза [58]

ние Akt, активацию PKC и ингибирование MAPкиназы. Кофилин-1, внутриклеточный актинмодулирующий белок, связывает и деполимеризует нитевидный F-актин и ингибирует полимеризацию мономерного G-актина, а также участвует в перемещении комплекса актин-кофилин из цитоплазмы в ядро, играя доминирующую роль в индуцированном Ang(1–7) торможении клеточного цикла в стадии G0/G1 и аутофагии ЭК аорты человека [70].

Рецепторы VEGF1-3 содержат внеклеточный сегмент с семью иммуноглобулин-подобными доменами, трансмембранный сегмент, юкстамембранный сегмент, протеинкиназный домен со вставкой примерно из 70 аминокислотных остатков и С-концевой хвост. VEGF-А стимулирует активацию преформированных димеров VEGFR2 путем аутофосфорилирования остатков тирозина в сегменте активации с последующим фосфорилированием тирозиновых остатков других белков, что приводит к рекрутированию фосфотирозин-связывающих белков и сигналингу через ERK1/2, AKT, Src и p38 MAP-киназные пути [71]. Формирование кровеносных сосудов происходит, главным образом, за счет ангиогенеза – прорастания ЭК из существующих сосудов. Сосудистая сеть расширяется, когда ростки образуют новые соединения, а анастомозы сосудов пространственно регулируются VEGFR1 (Flt1), который действует как рецептор-ловушка [72]. VEGFR1 модулирует активность VEGFR2, главного регулятора васкулогенеза и ангиогенеза. Окисленные липопротеины низкой плотности (ox-LDL) нарушают ангиогенез посредством деградации VEGFR2 и подавляют образование колец ЭК пупочной вены, заодно индуцируя их апоптоз [73]. VEGFR3 и его лиганды (VEGF-C и VEGF-D) участвуют в основном в лимфангиогенезе [71].

Помимо сигнального пути от рецептора VEGF, в ЭК существует другой специфический сигнальный путь – через систему ангиопоэтин (Angpt)-Tie, необходимую для эмбрионального развития сердечно-сосудистой и лимфатической систем. Система Angpt-Tie также контролирует постнатальный ангиогенез, ремоделирование и проницаемость сосудов. Эта система задействована в патогенезе многих заболеваний, таких как рак, сепсис, диабет, атеросклероз и ряд других. Мутации в системе сигналинга Tie-2 нарушают морфогенез сосудов, обусловливая венозные мальформации и первичную врожденную глаукому [74]. В ЭК довольно ярко выражена экспрессия Tie-2, его паралога Tie-1, тирозинфосфатазы VE-PTP и лиганда Angpt-2 [56], тогда как Angpt-1 секретируется перицитами [75]. В здоровой сосудистой сети Tie-2 фосфорилируется по остаткам тирозина во внутриклеточном домене, способствуя усилению барьерной и противовоспалительной функции. При воспалении одновременно происходит быстрое высвобождение Angpt-2 из WBP и активация его транскрипции; Angpt-2 является антагонистом Angpt-1, подавляя сигналинг через Tie-2 [56]. Гипоксия усиливает экспрессию Angpt-1 благодаря опосредованной НІF2α активации транскрипции в перицитах [76]. В то же время, в условиях гипоксии в ЭК возрастает активность VE-PTP, что обусловливает подавление активации Tie-2 эндотелиальным Angpt-2; особенно этот процесс выражен при неоваскуляризации сетчатки [78]. Тіе-2, активированный Angpt-1, стимулирует GTP-азу Rap1, которая сокращает радиальные (стрессовые) волокна посредством Rac1 и немышечного миозина II, независимо от VE-кадгерина. С другой стороны, связка Angpt1-Tie2 также рекрутирует VE-PTP в межэндотелиальные контакты, где VE-PTP дефосфорилирует Tie-2, повышая проницаемость сосудов [74]. Кроме того, активация VEGFR2-зависимого сигнального пути вызывает фосфорилирование VE-кадгерина с последующим бетааррестин-зависимым эндоцитозом VE-кадгерина и разрывом межэндотелиальных контактов [77]. При этом в межэндотелиальных контактах VE-РТР дефосфорилирует VEGFR2 посредством Tie2-зависимого механизма. Это подавляет фосфорилирование по тирозину VE-кадгерина, способствуя усилению функциональной интеграции ЭК и образованию просвета в капиллярах [74]. Таким образом, эндотелиальная проницаемость контролируется посредством сложного взаимодействия ангиопоэтинов, VEGF, их рецепторов, VE-кадгерина и VE-PTP. Таргетная терапия, направленная на VE-PTP и другие компоненты этого молекулярного комплекса, может стабилизировать кровеносные сосуды, по крайней мере, у пациентов с заболеваниями сетчатки и сосудистой оболочки глаза [78].

Молекулы клеточной адгезии (САМ) составляют значительную группу (не менее двух десятков) эндотелиальных маркеров, которые участвуют в гомо- или гетерофильном связывании с другими клетками или внеклеточным матриксом. Все представители основных четырех семейств САМ (иммуноглобулины, интегрины, кадгерины и селектины), включая IgG, экспрессируются на поверхности ЭК [50]. Молекула адгезии тромбоцитов и эндотелиальных клеток (PECAM-1, CD31) – белок 130 кДа, который широко представлен в эндотелиальных и кроветворных клетках. Он поддерживает целостность кровеносных сосудов и участвует, несмотря на название, главным образом во взаимодействии лейкоцитов с эндотелием и их трансэндотелиальной миграции при воспалении [79]. Повреждение ЭК, образующих ГЭБ, является одним из патогенетических или сопутствующих факторов болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянного склероза, некоторых случаев бактериального менингита, травмы и ишемии, связанной с наличием опухоли. PECAM-1 и его растворимая форма (sPECAM-1) являются потенциальными маркерами этих и других заболеваний и возможными мишенями для терапии.

Воспаление модулирует экспрессию генов посредством активации NF-кВ и других транскрипционных факторов. Медиаторы воспаления могут влиять на проницаемость ГЭБ через RLIP76 (также известный, как RALBP1), АТР-зависимый транспортер конъюгатов электрофил-глутатион [56]. Адгезивные контакты являются основным компонентом межклеточной адгезии, они состоят из трансмембранных кадгеринов, образующих гомотипические взаимодействия между соседними клетками и взаимодействующих с цитоплазматическими катенинами, которые, в свою очередь, взаимодействуют с цитоскелетом. При воспалении алгезивные контакты разъединяются, и через образующиеся щели происходит диффузия малых молекул и миграция лейкоцитов. Адгезия лейкоцитов к ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) и CD47 индуцирует активацию малых ГТФаз (Rac1, RhoA, RhoG) и сигналинг через РТК, сопряженный с активацией Src и Pvk2 [6]. ICAM-1 является одной из главных молекул адгезии, которая обусловливает изменения проницаемости сосудов и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Экспрессия ICAM-1 увеличивается после активации ЭК провоспалительными стимулами, действие которых опосредуется сигнальными путями с vyaстием Akt/PKB. NF-кB. МАР-киназы p38 и ERK1/2 [80]. В ЭК сосудов мозга экспрессия ICAM-1 увеличивается через 4 ч после действия стимула и остается повышенной до 72 ч даже после кратковременного воздействия [81]. Белок ІСАМ-1 связывается с интегринами CD11/CD18 и LFA-1 лейкоцитов, в основном нейтрофилов, после чего они легко проникают в ткани [82]. Важно отметить, что это взаимодействие обусловливает усиленную генерацию Н₂O₂ нейтрофилами, т.е. является необходимым условием формирования положительной обратной связи. В условиях in vivo с поверхности ЭК удаляется ІСАМ-1 (шеддинг), который затем действует как независимый сигнальный агент, поддерживающий воспалительный процесс в эндотелии [83]. Более того, после взаимодействия с лигандами происходит рециркуляция ICAM-1: интернализация, передача сигнала в лизосомы и реинтеграция в плазматическую мембрану [84]. Этот процесс контролируется РКС и Na⁺/H⁺-обменником, которые способствуют удержанию и/или интеграции ICAM-1 в плазматической мембране ЭК [85]. Таким образом, исследования регуляции эндотелиального фенотипа довольно интересны, важны и имеют большие перспективы.

МОДУЛЯТОРЫ СОСТОЯНИЯ И СТАРЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК. ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД

Воздействие многих факторов определяет фенотип и продолжительность жизни ЭК. В течение минут они реагируют на изменения гемодинамики, а также на вазоактивные, тромбогенные или воспалительные агенты. Быстрые ответы следуют за линейными рецептор-опосредованными сигнальными путями, сопряженными с входом и/или мобилизанией ионов кальния, активанией фосфорилирования и различных ферментов. Во многих случаях дисбаланс кальция предшествует АФК-индуцированной дисфункции ЭК. Резервуарами ионов кальция служат эндоплазматический ретикулум (ЭР), митохондрии, аппарат Гольджи илизосомы . В ЭК около 75% ионов Ca²⁺ находится в ЭР и до 25% – в митохондриях [86]. Митохондрии ЭК представляют собой разветвленную сеть, находящуюся в плотном контакте с кальциевыми каналами ЭР и плазматической мембраной [87]. Выявлено 11 молекулярных источников митохондриальных АФК [18]. Реперфузия/реоксигенация индуцирует кальциевые колебания [88], которые влияют на состояние митохондрий и усиливают генерацию АФК [89], а также экспрессию и экзоцитоз молекул адгезии [90]. Это усугубляет патологическое состояние эндотелия за счет инфильтрации лейкоцитов, которые вырабатывают собственные АФК. В свою очередь, АФК активируют IP3- и рианодиновые кальциевые каналы ЭР и некоторые каналы суперсемейства TRP плазматической мембраны, что приводит к кальциевой перегрузке ЭК [91]. В ЭК TRPM2 рассматривается в качестве основных каналов для входа ионов Ca²⁺ [92]. TRPM2 неселективные катионные каналы, их эндогенными лигандами являются ADP-рибоза (ADPr) и адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты (NAADP), но ионы Ca^{2+} и молекулы H_2O_2 могут потенцировать активацию TRPM2 [93]. Каналы TRPM2 считаются сенсорами оксидативного стресса и редокс-статуса клеток, а их активация обусловливает дисфункцию эндотелия и повышает вероятность гибели клеток [94]. Так, внеклеточное накопление амилоида-β (Аβ) при болезни Альцгеймера нарушает эндотелиальную структуру и функцию посредством активации TRPM2, приводя к перегрузке клеток ионами Са²⁺ и вазомоторной дисфункции [95]. Экзогенный пероксид водорода повышает [Ca²⁺], и снижает трансмембранное электрическое сопротивление в ЭК микрососудов легкого посредством активации TRPV4 [96]. Кроме того, H_2O_2 в низких нетоксических концентрациях вызывает повышение $[Ca^{2+}]_i$ в культивируемых ЭК пупочной вены за счет высвобождения кальция через двупоровые каналы из эндолизосомных везикул [97].

Механизмы развития барьерной дисфункции эндотелия могут варьировать в зависимости от активирующего агента и преобладающего или первичного типа АФК. Поскольку H_2O_2 является наиболее стабильным видом АФК, он используется в большинстве экспериментов для модификации редокс-состояния клеток и исследования сигнальных и токсических эффектов АФК. Эффект цитотоксической H_2O_2 на ЭК связан с истощением внутриклеточного глутатиона, активацией редокс-чувствительных киназ р38 МАРК, JNK, передачей сигналов Akt с участием NF-кB, повышенной экспрессией альдозоредуктазы, снижением уровня Sirt6, а также усилением экспрессии и активности β -галактозидазы [98, 99].

Большинство клеток млекопитающих могут реагировать на стрессовые факторы особым изменением фенотипа, связанным не с гибелью, а со старением клеток. В ЭК этот фенотип является провоспалительным, проатеросклеротическим и протромботическим [100]. Различают два типа клеточного старения: репликативное старение с истощением теломер и вызванное стрессом преждевременное старение без вовлечения теломер. Оба типа старения клеток приводят к остановке роста ЭК и нарушению их функций, способствуя тем самым развитию сердечно-сосудистых заболеваний [101]. Так, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой и эндотелиновой систем вызывает эндотелиальную дисфункцию, ремоделирование сосудов и старение эндотелия, вызывая выработку АФК и стимулируя воспаление и рост клеток [102]. Изменения в метаболизме оксида азота и простаноидов, эндотелина-1, тромбомодулина и VWF влияют на прокоагулянтный статус, подчеркивая роль эндотелия в развитии тромбоза [103]. Сиртуины SIRT1, SIRT3 и SIRT6 препятствуют старению ЭК и сосудов [101]. Параллельно со старением и при хроническом оксидативном стрессе, воспалении, влиянии инсулиноподобного фактора роста II, трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) ЭК могут способствовать развитию фиброза посредством эндотелиально-мезенхимального перехода (EndoMT) [104]. Это процесс, при котором определенные субпопуляции ЭК утрачивают эндотелиальные характеристики и трансформируются в гладкомышечные или мезенхимоподобные клетки, подверженные дальнейшей редифференцировке в клетки мезодермальной природы, включая остеобласты, хондроциты и адипоциты [105]. Иници-

ирование перепрограммирования осуществляется при участии специфических для EndoMT транскрипционных факторов Slug, Snail, Twist и Zeb1/2. Это событие связано с потерей апикально-базальной полярности и разрывом межклеточных контактов. Важно отметить, что эти изменения сохраняются и после удаления индуцирующих агентов и сопряжены с функциональными изменениями: уменьшением захвата ацетилированных ЛПНП, миграционной способности, обретением способности синтезировать коллаген de novo [106]. До сих пор неясно, какие регуляторные сигналы определяют полный или частичный EndoMT. Определенную роль в этом процессе играет контакт-зависимый сигнальный путь Notch [107]. EndoMT способствует развитию фиброза сердна. легких, печени, роговицы и других органов.

Связывание TGF-β с последующей активацией Smad-зависимого и Smad-независимого сигналинга считается наиболее важным путем инициации EndoMT [108]. Повышенная экспрессия NOX4, вызванная TGF-β, приводит к Snail1-опосредованному EndoMT. Кроме того, ET-1 синергически усиливает EndoMT, индуцированный TGF-β, с участием канонических путей Smad. Еще один фактор, индуцирующий EndoMT посредством HIF1α-опосредованной активации Snail1, важнейшего регулятора EndoMT, является гипоксия. Уровень Snail1 регулируется GSK3опосредованным фосфорилированием Snail1, который подвергается протеасомной деградации. Кавеолин Cav1, напротив, подавляет EndoMT через интернализацию рецепторов TGF-β с их последующей деградацией. EndoMT также модулируется морфогенами Wnt, Sonic Hh, Notch и др. Если в результате этих внутриклеточных сигнальных событий активируются гены, специфичные для мезенхимных клеток, то это приводит к усилению синтеза миофибробласт-специфических и профибротических макромолекул. включая α-SMA. COL1, COL3, FN, COMP и TIM (ингибитор ММР). Одновременно происходит подавление ЭК-специфических маркеров, таких как CD31/ РЕСАМ-1, VE-кадгерин и VWF, что приводит к фенотипическому превращению ЭК в миофибробласты, ответственные за фиброзный процесс [108].

Показано, что уровень микроРНК-20a (miR-20a) снижается при EndoMT, и восстановление его экспрессии под действием фактора роста фибробластов (FGF)-2 коррелирует с регрессией EndoMT [109]. Напротив, уровень miR-21 повышается после воздействия TGF-β, что приводит к усилению EndoMT, тогда как блокада экспрессии эндотелиальной miR-21 подавляет EndoMT [110]. Таким образом, эти две микроРНК действуют, соответственно, выше (miR-20a) и ниже (miR-21) активированного TGF-β сигналинга [111]. Считается, что TGF-β является основным медиатором EndoMT, тогда как костный морфогенетический

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

белок 7 (ВМР-7), обозначаемый также как остеогенный белок-1 (OP-1), и FGF могут как усиливать, так и ослаблять TGF-управляемый EndoMT в зависимости от условий [112]. Кроме того, эндотелиальная аутофагия также снижает уровень EndoMT. Индукторы аутофагии, рапамицин и трегалоза, противодействовали EndoMT в результате подавления фосфорилирования Smad3 и снижения экспрессии Snail [113]. В 2014 году были опубликованы результаты, показывающие способность фибробластов сердца принимать эндотелиальный фенотип после острого ишемического повреждения [114]. ЭК, образованные из фибробластов, имеют морфофункциональные характеристики нативных ЭК; более того, индукция р53 в фибробластах сердца усиливает мезенхимально-эндотелиальный переход, улучшает кровообращение и функциональное состояние сердца.

Для подавления EndoMT при интерстициальном заболевании легких, связанном с системным склерозом, клиницисты назначают циклофосфамид, тогда как микофенолат или метотрексат используют при менее опасном поражении кожи. Среди новых препаратов, модулирующих фиброз и воспаление при системном склерозе, отметим тоцилизумаб, пирфенидон, ингибиторы тирозинкиназы, лизофосфатидную кислоту и ингибиторы NOX4 [115]. Перспективными представляются природные соединения: генипозид (иридоидный гликозид, выделенный из плодов гардении) и глицирризин (сапонин из корня солодки). Генипозид устраняет вызванную блеомицином утрату капилляров и фиброз, ослабляет экспрессию ключевых факторов EndoMT (Slug, Snail и Twist) и подавляет киназы mTOR и S6 [116]. Глицирризин также уменьшает кожный фиброз, вызванный блеомицином, что связано с блокадой сигналинга TGF-В в дермальных фибробластах посредством подавления тромбоспондина 1, латентного рецептора TGF-β и факторов транскрипции Smad3 и Ets1. У мышей, которым вводили глицирризин, блеомицин-зависимые нарушение иммунного ответа и EndoMT были выражены существенно меньше [117].

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ – ОСНОВА КОНЦЕПЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ МОЩНОСТИ

Эффективность работы в области экспериментальной и клинической медицины во многом зависит от широты наших представлений о реакции клеток на различные стимулы и предполагает разработку новых теоретико-прикладных инструментов. Одним из таких инструментов может стать концепция "цитотоксической мощности", первоначальная версия которой опубликована ранее [118]. Принятые в настоящее время понятия "апоптотического индекса" и "апоптотиче-

ского потенциала" недостаточны для адекватной количественной оценки и анализа проапоптотической активности химических веществ в пределах широкого диапазона терапевтических и токсических доз, поэтому в качестве альтернативы этим показателям была разработана концепция "цитотоксической мощности", суть которой состоит в том, что в экспериментах *in vitro* окончательные расчеты значений эффективности проводятся не только с учетом временного развития процесса гибели клеток, но также с учетом соотношения количества вещества к числу исследуемых клеток. Цитотоксическую мощность (Р) вещества можно математически представить в виде отношения произведения количества вещества (S), выраженного в молях. на интенсивность цитотоксического процесса (І, частный случай интенсивности сигнала, свидетельствующего об экспрессии того или иного маркера ЭК или других клеток) к квадрату числа клеток за единицу времени (t):

$$P=\frac{IS}{n^2t}.$$

Концепция и соответствующий алгоритм вычисления мощности позволяют выполнить корректную трансформацию квантованной зависимости в градуальную, основанную на стратегии многофакторного поиска, и, наряду с относительно универсальными и неспецифическими показателями цитотоксичности, выявить и истканеспецифические пользовать показатели (маркеры) – компоненты так называемого фенома. Для клеточной гибели любого типа можно выявить маркеры, уровень (количество) которых постепенно повышается или снижается перед гибелью клетки. Уровень экспрессии каждого маркера зависит от дозы (количества) цитотоксического вещества. Важно отметить, что мы наблюдаем экспрессию в живых клетках вне зависимости от того, какой процент погибших клеток регистрируется. Более того, наряду с этим мы можем определять экспрессию маркеров клетками на стадии раннего апоптоза или аутофагии, поскольку эти клетки считаются еще живыми. Таким образом, интенсивность развития того или иного сигнала отражает повышение числа дискретных, функционально сопряженных, относительно стабильных и, в то же время, переходных внутриклеточных структур, являющихся компонентами клеточного фенома - мы называем их "фенами" (F). В таком случае интенсивность или мошность шитотоксического процесса можно выразить формулой I = F/t. Единицей измерения цитотоксической мощности вещества является "мольфен" — количество наномолей вещества, изменяющего интенсивность экспрессии фенотипических маркеров (компонентов фенома) на 100 условных единиц в час с момента начала воздействия на 1000 клеток. Это определение,

не претендующее на завершенность и полноту, придает особое значение количественному соотношению фенов и числа клеток, а также различным начальным состояниям клеток, что объясняет различия в динамике клеточной гибели внутри популяции. Концепция цитотоксической мощности может способствовать интеграции данных, полученных *in vitro* на различных типах клеток, с результатами исследований *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндотелий занимает стратегическое положение между кровью и интерстициальными тканями, так что ЭК как никакие другие интегрируют в себе функции барьерной ткани, источника многочисленных медиаторов и участника многих физиологических процессов. В силу этого ЭК вольно или невольно служат объектом самых разных видов терапии. Патология сосудов обусловлена, как правило, множеством факторов, включая генетические и факторы среды, так что реакция клеток на широкий спектр воздействий также имеет многомерный характер, но современные методы лечения направлены в основном на отдельные сигнальные молекулы, участвующие в патофизиологических путях. Такой подход к изучению фенотипа по умолчанию регулируется гипотезой "один ген/один признак". Тем временем, омик-технологии позволяют описать происхождение (этиологию) и сущность (патофизиологию) ЭК-зависимых патологий в виде совокупности "больших данных" (big data) как нового информационно-технологического феномена, а также выявить новые отношения между множеством и вариабельностью данных, с одной стороны, и ограниченным по своей сути традиционным определением клинических фенотипов сосудистых заболеваний, с другой стороны [119].

Феномика, стратегия которой была объявлена около двух десятилетий назад [120], постепенно изменила традиционный подход фенотип/генотип/геном на новую парадигму биологического исследования - триаду феном/геном/протеом. Феном – это совокупность всех фенотипических признаков организма, обусловленных экспрессией генома и специфическим воздействием окружающей среды, причем в динамике. Феномика – это новый подход к определению количественной корреляции между множественными фенотипическими признаками и вариабельностью транскриптома, протеома, метаболома, интерактома и факторов окружающей среды, наряду с геномом. Развитие феномики позволит не только определить набор биомаркеров для диагностики патологии сосудов, но и выявит новые цели для комбинированной терапии, а также новые системы тестирования для оценки химической безопасности и/или терапевтической эффективности веществ (воздействий в широком смысле), тем самым совершив революционный сдвиг парадигмы доклинического тестирования препаратов [119].

В настоящее время повышенное внимание привлекают показатели качества диеты в целом, в отличие от отдельных компонентов питания или его калорийности. Это особенно актуально для оценки состояния эндотелия и корректировки сосудистых заболеваний. Существует тесная связь между структурой питания и экспрессией эндотелиальных маркеров. Условно здоровые продукты или блюда, в частности, фрукты и овощи, потребляемые регулярно, оказывают положительное влияние на функциональное состояние эндотелия, что можно оценить по уровню его маркеров, таких как молекулы sICAM-1, sVCAM-1, Е-селектин и ряд других. "Западная" диета (преимущественно мясо, сладости, рафинированные продукты и жареные блюда) коррелирует с маркерами воспаления и атерогенеза [121]. Кроме того, умеренная физическая активность положительно влияет как на маркеры эндотелия, так и на когнитивные способности у пожилых людей [122].

Новые концепции, методы исследований, обработки данных и целевого воздействия на клетки и организм в целом дают нам уверенность в разработке более естественных подходов к решению проблем здоровья сосудов и заболеваний человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-15-00417).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Gimbrone M. 1986. Vascular endothelium: Nature's blood container. In: *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis*. New York: Churchill Livingstone, pp. 1–13.
- 2. Wolinsky H. 1980. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ. Res.* **47** (3), 301–311.
- Deracinois B., Lenfant A.M., Dehouck M.P., Flahaut C. 2015. Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) in vessels of the brain. *Subcell. Biochem.* 76, 125–151.
- 4. Ishii Y., Langberg J., Rosborough K., Mikawa T. 2009. Endothelial cell lineages of the heart. *Cell Tissue Res.* **335** (1), 67–73.
- 5. van Hinsbergh V.W.M. 2012. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* **34** (1), 93–106.
- Adam A.P. 2015. Regulation of endothelial adherens junctions by tyrosine phosphorylation. *Mediators Inflamm.* 2015, Article ID 272858, 24.
- 7. Aird W.C. 2012. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2** (1), article a006429.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

- Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E. 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev Neurosci.* 7 (1), 41–53.
- 9. Ransohoff R.M., Engelhardt B. 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* **12** (9), 623–635.
- Meresse S., Dehouck M.P., Delorme P., Bensaïd M., Tauber J.P., Delbart C., Fruchart J.C., Cecchelli R. 1989. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. J. Neurochem. 53 (5), 1363–1371.
- Yu C., Kastin A.J., Ding Y., Pan W. 2007. Gamma glutamyl transpeptidase is a dynamic indicator of endothelial response to stroke. *Exp. Neurol.* 203 (1), 116– 122.
- Bendayan M. 2002. Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microsc. Res. Tech.* 57 (5), 327–349.
- Metzger R., Franke F.E., Bohle R.M., Alhenc-Gelas F., Danilov S.M. 2011. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: Vessel, organ and species specificity. *Microvasc. Res.* 81 (2), 206–215.
- Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., Nishigaki Y., Sakthisekaran D., Sethi G., Nishigaki I. 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9 (10), 1057–1069.
- Mai J., Virtue A., Shen J., Wang H., Yang X.F. 2013. An evolving new paradigm: Endothelial cells – conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol.* 6 (1), 61.
- Mutin M., Dignat-George F., Sampol J. 1997. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: Quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens.* 50 (5), 449–458.
- Kudryavtsev I.V., Garnyuk V.V., Nadeev A.D., Goncharov N.V. 2014. Hydrogen peroxide modulates expression of surface antigens by human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Biochem*. (*Moscow*) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol. 8 (1), 97–102.
- 18. Mailloux R.J. 2015. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* **4**, 381–398.
- Sturza A., Duicu O.M., Vaduva A., Dănilă M.D., Noveanu L., Varró A., Muntean D.M. 2015. Monoamine oxidases are novel sources of cardiovascular oxidative stress in experimental diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **93** (7), 555–561.
- Goncharov N., Avdonin P., Nadeev A., Zharkikh I., Jenkins R. 2015. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 21 (9), 1134– 1146.
- Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest. 52 (11), 2745– 2756.
- Jaffe E.A., Hoyer L.W., Nachman R.L. 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **71** (5), 1906–1909.
- 23. Goncharov N.V., Nadeev A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. 2017. Markers and biomarkers of endothe-

lium: When something is rotten in the state. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017, Article ID 9759735, 27. doi 9759735

- Petrovic N., Schacke W., Gahagan J.R. O'Conor C.A., Winnicka B., Conway R.E., Mina-Osorio P., Shapiro L.H. 2007. CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood.* 110 (1), 142–150.
- 25. Yamamoto H., Ehling M., Kato K. Kanai K., van Lessen M., Frye M., Zeuschner D., Nakayama M., Vestweber D., Adams R.H. 2015. Integrin β1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat. Commun.* 6, 6429.
- Zhang Y., Li H., Wei R. Ma J., Zhao Y., Lian Z., Liu Z. 2015. Endothelial cells regulate cardiac myocyte reorganisation through β1-integrin signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (5), 1808–1820.
- Riccieri V., Stefanantoni K., Vasile M. Macrì V., Sciarra I., Iannace N., Alessandri C., Valesini G. 2011. Abnormal plasma levels of different angiogenic molecules are associated with different clinical manifestations in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29 (2, Suppl. 65), S46–S52.
- Sidney L.E., Branch M.J., Dunphy S.E., Dua H.S., Hopkinson A. 2014. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 32 (6), 1380–1389.
- Park L., Wang G., Moore J., Girouard H., Zhou P., Anrather J., Iadecola C. 2014. The key role of transient receptor potential melastatin-2 channels in amyloidβ-induced neurovascular dysfunction. *Nat. Commun.* 5, 5318.
- Takahashi-Sato K., Murakawa M., Kimura J., Ito M.A., Matsuoka I. 2013. Loss of ectonucleotidases from the coronary vascular bed after ischemia-reperfusion in isolated rat heart. *BMC Cardiovasc. Disord.* 3 (1), 53.
- Helenius M.H., Vattulainen S., Orcholski M., Aho J., Komulainen A., Taimen P., Wang L., de Jesus Perez V.A., Koskenvuo J.W., Alastalo T.P. 2015. Suppression of endothelial CD39/ENTPD1 is associated with pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 308 (10), L1046–L1057.
- Beldi G., Wu Y., Sun X., Imai M., Enjyoji K., Csizmadia E., Candinas D., Erb L., Robson S.C. 2008. Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology.* 135 (5), 1751–1760.
- 33. Sakimoto S., Marchetti V., Aguilar E., Lee K., Usui Y., Murinello S., Bucher F., Trombley J.K., Fallon R., Wagey R., Peters C., Scheppke E.L., Westenskow P.D., Friedlander M. 2017. CD44 expression in endothelial colony-forming cells regulates neurovascular trophic effect. JCI Insight. 2 (2), article e89906.
- Mund J.A., Estes M.L., Yoder M.C., Ingram D.A., Case J. 2012. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (4), 1045–1053.
- 35. Martinelli R., Newton G., Carman C.V., Greenwood J., Luscinskas F.W. 2013. Novel role of CD47 in rat microvascular endothelium: Signaling and regulation of T-cell transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (11), 2566–2576.

- Page A.V., Liles W.C. 2013. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*. 4 (6), 507–516.
- 37. Cho J., Kennedy D.R., Lin L., Huang M., Merrill-Skoloff G., Furie B.C., Furie B. 2012. Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation *in vivo* depends on the presence of β 3 integrins. *Blood*. **120** (3), 647–655.
- 38. Satoh S., Suzuki A., Asari Y., Sato M., Kojima N., Sato T., Tsuchiya N., Sato K., Senoo H., Kato T. 2002. Glomerular endothelium exhibits enhanced expression of costimulatory adhesion molecules, CD80 and CD86, by warm ischemia/reperfusion injury in rats. *Lab. Invest.* 82 (9), 1209–1217.
- Goldie L.C., Lucitti J.L., Dickinson M.E., Hirschi K.K. 2008. Cell signaling directing the formation and function of hemogenic endothelium during murine embryogenesis. *Blood.* 112 (8), 3194–3204.
- Huizer K., Mustafa D.A.M., Spelt J.C., Kros J.M., Sacchetti A. 2017. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol. *PLoS One.* 12 (9), e0184895. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184895
- Rossi E., Poirault-Chassac S., Bieche I., Chocron R., Schnitzler A., Lokajczyk A., Bourdoncle P., Dizier B., Bacha N.C., Gendron N., Blandinieres A., Guerin C.L., Gaussem P., Smadja D.M. 2019. Human endothelial colony forming cells express intracellular CD133 that modulates their vasculogenic properties. *Stem Cell Rev.* https://doi.org/10.1007/s12015-019-09881-8
- 42. Golab-Janowska M., Paczkowska E., Machalinski B., Kotlega D., Meller A., Nowacki P., Krzysztof S., Pawel W. 2019. Elevated inflammatory parameter levels negatively correlate with populations of circulating stem cells (CD133+), early endothelial progenitor cells. *Curr. Neurovasc. Res.* https://doi.org/10.2174/1567202616666190129164906
- 43. Vestweber D. 2008. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2), 223–232.
- 44. Jin H. J., Kwon J.H., Kim M., Bae Y.K., Choi S.J., Oh W., Yang Y.S., Jeon H.B. 2016. Downregulation of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) accelerates cellular senescence in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 5 (4), 427–439.
- 45. Zhou Y., Huang H., Yuan L.J., Xiong Y., Huang X., Lin J.X., Zheng M. 2015. CD146 as an adverse prognostic factor in uterine sarcoma. *Eur. J. Med. Res.* 20 (1), 67.
- Holmes K., Roberts O.L., Thomas A.M., Cross M.J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* 19 (10), 2003–2012.
- 47. Cui D., Arima M., Takubo K., Kimura T., Horiuchi K., Minagawa T., Matsuda S., Ikeda E. 2015. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxiainduced impairment of neural vascular barrier function. *Sci. Rep.* **5** (1), article 12796.
- Wei J., Liu C.J., Li Z. 2014. ADAMTS-18: A metalloproteinase with multiple functions. *Front. Biosci.* 19 (8), 1456–1467.

- Borst O., Abed M., Alesutan I., Towhid S.T., Qadri S.M., Föller M., Gawaz M., Lang F. 2012. Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 302 (4), C644–C651.
- Frigo G., Tramentozzi E., Orso G., Ceolotto G., Pagetta A., Stagni C., Menin C., Rosato A., Finotti P. 2016. Human IgGs induce synthesis and secretion of IgGs and neonatal Fc receptor in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*. 221 (12), 1329– 1342.
- 51. Garmy-Susini B., Jin H., Zhu Y., Sung R.J., Hwang R., Varner J. 2005. Integrin $\alpha_4\beta_1$ –VCAM-1–mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J. Clin. Invest.* **115** (6), 1542–1551.
- 52. Hale A.T., Tian H., Anih E., Recio F.O. 3rd, Shatat M.A., Johnson T., Liao X., Ramirez-Bergeron D.L., Proweller A., Ishikawa M., Hamik A. 2014. Endothelial Krüppel-like factor 4 regulates angiogenesis and the Notch signaling pathway. J. Biol. Chem. 289 (17), 12016–12028.
- Yoshida T., Yamashita M., Iwai M., Hayashi M. 2016. Endothelial Krüppel-like factor 4 mediates the protective effect of statins against ischemic AKI. J. Am. Soc. Nephrol. 27 (5), 1379–1388.
- Briot A., Bouloumie A., Iruela-Arispe M.L. 2016. Notch, lipids, and endothelial cells. *Curr. Opin. Lipidol.* 27 (5), 513–520.
- 55. Bennani-Baiti B., Toegel S., Viernstein H., Urban E., Noe C.R., Bennani-Baiti I.M. 2015. Inflammation modulates RLIP76/RALBP1 electrophile-glutathione conjugate transporter and housekeeping genes in human blood-brain barrier endothelial cells. *PLoS One.* 10 (9), article e0139101.
- Milam K.E., Parikh S.M. 2015. The angiopoietin-Tie2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation. *Tissue Barriers*. 3 (1–2), article e957508.
- 57. Kellett K.A.B., Hooper N.M. 2015. The role of tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) in neurodegenerative diseases: Alzheimer's disease in the focus. *Subcell. Biochem.* **76**, 363–374.
- Starke R.D., Ferraro F., Paschalaki K.E., Dryden N.H., McKinnon T.A., Sutton R.E., Payne E.M., Haskard D.O., Hughes A.D., Cutler D.F., Laffan M.A., Randi A.M. 2011. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood.* 117 (3), 1071–1080.
- Valentijn K.M., Eikenboom J. 2013. Weibel–Palade bodies: A window to von Willebrand disease. J. Thromb. Haemost. 11 (4), 581–592.
- Lenting P.J., Christophe O.D., Denis C.V. 2015. Von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: Connecting the far ends. *Blood.* 125 (13), 2019–2028.
- Turner N.A., Nolasco L., Ruggeri Z.M., Moake J.L. 2009. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: Production, release, and VWF string cleavage. *Blood.* 114 (24), 5102–5111.
- 62. Shim K., Anderson P.J., Tuley E.A., Wiswall E., Evan Sadler J. 2008. Platelet–VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood.* **111** (2), 651–657.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

- 63. Randi A.M., Laffan M.A. 2017. Von Willebrand factor and angiogenesis: Basic and applied issues. *J. Thromb. Haemost.* **15** (1), 13–20.
- 64. Bönner G. 1990. Kinin-related effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Clin. Physiol. Biochem.* 8 (Suppl. 1), 6–15.
- 65. Hemming M.L., Selkoe D.J. 2005. Amyloid β -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J. Biol. Chem.* **280** (45), 37644–37650.
- 66. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. **426** (6965), 450–454.
- 67. Gaddam R., Chambers S., Bhatia M. 2014. ACE and ACE2 in inflammation: A tale of two enzymes. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* **13** (4), 224–234.
- 68. Iwai M., Horiuchi M. 2009. Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT₁ receptor axis vs. ACE2–angiotensin-(1–7)–mas receptor axis. *Hypertens. Res.* **32** (7), 533–536.
- Chappell M.C. 2007. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1–7)-MAS receptor axis: More than regulation of blood pressure? *Hypertension*. 50 (4), 596–599.
- Wang H.J., Chen S.F., Lo W.Y. 2016. Identification of Cofilin-1 induces G0/G1 arrest and autophagy in angiotensin-(1–7)-treated human aortic endothelial cells from iTRAQ quantitative proteomics. *Sci. Rep.* 6, article 35372.
- Roskoski R. Jr. 2017. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor inhibitors in the treatment of renal cell carcinomas. *Pharmacol. Res.* 120, 116–132.
- Nesmith J.E., Chappell J.C., Cluceru J.G., Bautch V.L. 2017. Blood vessel anastomosis is spatially regulated by Flt1 during angiogenesis. *Development*. 144 (5), 889– 896.
- Zhang M., Jiang L. 2016. Oxidized low-density lipoprotein decreases VEGFR2 expression in HUVECs and impairs angiogenesis. *Exp. Ther. Med.* 12 (6), 3742–3748.
- Eklund L., Kangas J., Saharinen P. 2017. Angiopoietin-tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clin. Sci. (Lond.).* 131 (1), 87–103.
- Armulik A., Genove G., Betsholtz C. 2011. Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell.* 21 (2), 193–215.
- 76. Park Y.S., Kim G., Jin Y.M., Lee J.Y., Shin J.W., Jo I. 2016. Expression of angiopoietin-1 in hypoxic pericytes: Regulation by hypoxia-inducible factor- 2α and participation in endothelial cell migration and tube formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469** (2), 263–269.
- Gavard J., Gutkind J.S. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β-arrestindependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 8 (11), 1223–1234.
- Shen J., Frye M., Lee B.L., Reinardy J.L., McClung J.M., Ding K., Kojima M., Xia H., Seidel C., Lima e Silva R.,

Dong A., Hackett S.F., Wang J., Howard B.W., Vestweber D., Kontos C.D., Peters K.G., Campochiaro P.A. 2014. Targeting VE-PTP activates TIE2 and stabilizes the ocular vasculature. *J. Clin. Invest.* **124** (10), 4564– 4576.

- 79. Kalinowska A., Losy J. 2006. PECAM-1, a key player in neuroinflammation. *Eur. J. Neurol.* **13** (12), 1284– 1290.
- Li Q., Syrovets T., Simmet T., Ding J., Xu J., Chen W., Zhu D., Gao P. 2013. Plasmin induces intercellular adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells via nuclear factor-κB/mitogen-activated protein kinases-dependent pathways. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 238 (2), 176–186.
- Wong D., Dorovini-Zis K. 1992. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J. Neuroimmunol.* **39** (1–2), 11–21.
- 82. Yang L., Froio R.M., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Alon R., Luscinskas F.W. 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-α-activated vascular endothelium under flow. *Blood.* **106** (2), 584–592.
- 83. Lawson C., Wolf S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol. Rep.* **61** (1), 22–32.
- Muro S., Gajewski C., Koval M., Muzykantov V.R. 2005. ICAM-1 recycling in endothelial cells: A novel pathway for sustained intracellular delivery and prolonged effects of drugs. *Blood.* 105 (2), 650–658.
- Muro S., Mateescu M., Gajewski C., Robinson M., Muzykantov V.R., Koval M. 2006. Control of intracellular trafficking of ICAM-1-targeted nanocarriers by endothelial Na⁺/H⁺ exchanger proteins. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290** (5), L809–L817.
- Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W.F. 2005. The role of mitochondria for Ca²⁺ refilling of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280 (13), 12114–12122.
- 87. Malli R., Frieden M., Osibow K., Zoratti C., Mayer M., Demaurex N., Graier W.F. 2003. Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is essential for mitochondrial Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling. *J. Biol. Chem.* **278** (45), 44769–44779.
- Hu Q., Ziegelstein R.C. 2000. Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation*. **102** (20), 2541–2547.
- Camello-Almaraz C., Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Camello P.J. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (5), C1082–C1088.
- Ichimura H., Parthasarathi K., Quadri S., Issekutz A.C., Bhattacharya J. 2003. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. J. Clin. Invest. 111 (5), 691–699.
- 91. Pires P.W., Earley S. 2017. Redox regulation of transient receptor potential channels in the endothelium. *Microcirculation*. **24** (3), article e12329.
- 92. Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R.J., Bruford E.A., Caterina M.J., Clapham D.E., Harteneck C., Heller S., Julius D., Kojima I., Mori Y., Penner R., Prawitt D., Scharenberg A.M., Schultz G., Shimizu N., Zhu M.X. 2002. A unified nomenclature

for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell.* **9** (2), 229–231.

- Sumoza-Toledo A., Penner R. 2011. TRPM2: A multifunctional ion channel for calcium signaling. *J. Physiol.* 589 (7), 1515–1525.
- 94. Hara Y., Wakamori M., Ishii M., Maeno E., Nishida M., Yoshida T., Yamada H., Shimizu S., Mori E., Kudoh J., Shimizu N., Kurose H., Okada Y., Imoto K., Mori Y. 2002. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell.* **9** (1), 163–173.
- Koizumi K., Wang G., Park L. 2016. Endothelial dysfunction and amyloid-β-induced neurovascular alterations. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36 (2), 155–165.
- 96. Suresh K., Servinsky L., Reyes J., Baksh S., Undem C., Caterina M., Pearse D.B., Shimoda L.A. 2015. Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **309** (12), L1467–L1477.
- 97. Avdonin P.V., Nadeev A.D., Tsitrin E.B., Tsitrina A.A., Avdonin P.P., Mironova G.Y., Zharkikh I.L., Goncharov N.V. 2017. Involvement of two-pore channels in the elevation of cytoplasmic Ca²⁺ level in human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide. *Dokl. Biochem. Biophys.* **474** (4), 1–4.
- 98. Lee J., Kang I.J., Bünger R., Kang Y.H. 2004. Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-κB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. J. Appl. Physiol. 96 (2), 793–801.
- Xie C.L., Hu L.Q., Pan Y.B., Qian Y.N. 2015. Propofol attenuation of hydrogen peroxide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells involves aldose reductase. *Pharmazie*. **70** (2), 103–109.
- Erusalimsky J.D. 2009. Vascular endothelial senescence: From mechanisms to pathophysiology. *J. Appl. Physiol.* **106** (1), 326–332.
- 101. Kida Y., Goligorsky M.S. 2016. Sirtuins, cell senescence, and vascular aging. *Can. J. Cardiol.* **32** (5), 634–641.
- 102. Savoia C., Battistoni A., Calvez V., Cesario V., Montefusco G., Filippini A. 2017. Microvascular alterations in hypertension and vascular aging. *Curr. Hypertens. Rev.* 13 (1), 16–23.
- Sepulveda C., Palomo I., Fuentes E. 2017. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. *Mech. Ageing Dev.* 164, 91–99.
- 104. Dijke P., Egorova A.D., Goumans M.J., Poelmann R.E., Hierck B.P. 2012. TGF-β signaling in endothelial-tomesenchymal transition: The role of shear stress and primary cilia. *Sci. Signal.* **5** (212).
- 105. Sanchez-Duffhues G., Orlova V., Ten Dijke P. 2016. In brief: Endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Path.* 238 (3), 378–380.
- 106. Rieder F., Kessler S.P., West G.A., Bhilocha S., de la Motte C., Sadler T.M., Gopalan B., Stylianou E., Fiocchi C. 2011. Inflammation-induced endothelialto-mesenchymal transition: A novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am. J. Pathol.* **179** (5), 2660–2673.
- 107. Welch-Reardon K.M., Wu N., Hughes C.C.W. 2015. A role for partial endothelial-mesenchymal transitions in angiogenesis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2), 303–308.

- 108. Piera-Velazquez S., Mendoza F., Jimenez S. 2016. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases. *J. Clin. Med.* **5** (4).
- 109. Correia A.C.P., Moonen J.R.A.J., Brinker M.G.L., Krenning G. 2016. FGF2 inhibits endothelial-mesenchymal transition through microRNA-20a-mediated repression of canonical TGF-β signaling. *J. Cell Sci.* **129** (3), 569–579.
- 110. Kumarswamy R., Volkmann I., Jazbutyte V., Dangwal S., Park D.H., Thum T. 2012. Transforming growth factor-β-induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32** (2), 361–369.
- Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. 2017. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat. Commun.* 8, article 14361.
- Medici D., Kalluri R. 2012. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Seminar. Cancer Biol.* 22 (5–6), 379–384.
- Wang J., Feng Y., Wang Y., Xiang D., Zhang X., Yuan F. 2017. Autophagy regulates endothelial-mesenchymal transition by decreasing the phosphorylation level of Smad3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487 (3), 740–747.
- 114. Ubil E., Duan J., Pillai I.C.L., Rosa-Garrido M., Wu Y., Bargiacchi F., Lu Y., Stanbouly S., Huang J., Rojas M., Vondriska T.M., Stefani E., Deb A. 2014. Mesenchymal–endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature*. **514** (7524), 585–590.
- 115. Mendoza F.A., Mansoor M., Jimenez S.A. 2016. Treatment of rapidly progressive systemic sclerosis: Current and futures perspectives. *Expert Opin. Orphan Drugs.* 4 (1), 31–47.

- 116. Qi Q., Mao Y., Tian Y., Zhu K., Cha X., Wu M., Zhou X. 2017. Geniposide inhibited endothelial-mesenchymal transition via the mTOR signaling pathway in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Am. J. Transl. Res.* 9 (3), 1025–1036.
- 117. Yamashita T., Asano Y., Taniguchi T., Nakamura K., Saigusa R., Miura S., Toyama T., Takahashi T., Ichimura Y., Yoshizaki A., Trojanowska M., Sato S. 2017. Glycyrrhizin ameliorates fibrosis, vasculopathy, and inflammation in animal models of systemic sclerosis. J. Invest. Dermatol. 137 (3), 631–640.
- 118. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Надеев А.Д., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Зинченко В.П., Авдонин П.В. 2018. Цитотоксическая мощность пероксида водорода по отношению к эндотелиальным клеткам in vitro. Биол. мембраны. 35 (1), 16–26.
- 119. Han Y., Li L., Zhang Y., Ye L., Zhao J., Duan D.D. 2015. Phenomics of vascular disease: The systematic approach to the combination therapy. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **13** (4), 433–440.
- 120. Schilling C.H., Edwards J.S., Palsson B.O. 1999. Toward metabolic phenomics: Analysis of genomic data using flux balances. *Biotechnol. Prog.* **15** (3), 288– 295.
- Defago M.D., Elorriaga N., Irazola V.E., Rubinstein A.L. 2014. Influence of food patterns on endothelial biomarkers: A systematic review. *J. Clin. Hypertens.* 16 (12), 907–913.
- 122. Alghadir A.H., Gabr S.A., Al-Eisa E.S. 2016. Effects of moderate aerobic exercise on cognitive abilities and redox state biomarkers in older adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, Article ID 2545168, 8.

Endothelial Markers in Health and Disease

N. V. Goncharov^{1, 2, *}, P. I. Popova³, P. P. Avdonin⁴, I. V. Kudryavtsev^{5, 6}, M. K. Serebryakova⁵, E. A. Korf¹, P. V. Avdonin⁴

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

²Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,

p.o. Kuz'molovskii, Leningrad oblast, 188663 Russia

³City Policlinic no. 19, St. Petersburg, 142238 Russia

⁴Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

⁵Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

⁶Far Easten Federal University, Vladivostok, 690091 Russia

*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Endothelial cells (EC) line the blood vessels and lymphatic vessels, as well as heart chambers, forming the border between the tissues, on the one hand, and blood or lymph, on the other. Such a strategic position of the endothelium determines its most important functional role in the regulation of vascular tone, hemostasis, and inflammatory processes. The damaged endothelium can be both a cause and a consequence of many diseases. The state of the endothelium is indicated by the phenotype of these cells, represented mainly by (trans)membrane markers (surface antigens). This review provides a definition of endothelial markers, lists many of them, discusses the mechanisms of their expression, and considers the role of the endothelium in certain pathological conditions.

Keywords: endothelium, markers, expression, cell aging, pathology

УДК 577.352;576

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ ГАМКергических НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА, СОДЕРЖАЩИХ ПРОНИЦАЕМЫЕ ДЛЯ КАЛЬЦИЯ КАИНАТНЫЕ И АМРА-РЕЦЕПТОРЫ

© 2020 г. В. П. Зинченко^{*a*}, *, С. Г. Гайдин^{*a*}, И. Ю. Теплов^{*a*}, А. М. Косенков^{*a*}, А. И. Сергеев^{*a*}, Л. П. Долгачева^{*a*}, С. Т. Тулеуханов^{*b*}

^аФедеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, Московская обл., 142290 Россия

^bКазахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, 050040 Казахстан

*e-mail: vpz@mail.ru Поступила в редакцию 15.05.2019 г. После доработки 25.08.2019 г. Принята к публикации 26.08.2019 г.

Проницаемые для кальция каинатные (CP-KAR) и AMPA-рецепторы (CP-AMPAR) нейронов мозга являются активными участниками синаптической пластичности и запуска процесса секреции нейротрансмиттеров. В настоящей работе нейроны, содержащие СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы, идентифицировали в нейроглиальной культуре гиппокампа на 14–17 день культивирования по характерному Ca²⁺-ответу на агонист КА- и АМРА-рецепторов, домоевую кислоту (DA) и селективный агонист СР-КАRs, ATPA. Показано, что DA в концентрации 300 нМ вызывала быстрый рост внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в двух минорных субпопуляциях нейронов. Обе субпопуляции оказались ГАМКергическими нейронами и положительно окрашивались антителами против глутаматдекарбоксилазы 65 и 67 (GAD65/67). Ингибитор CP-AMPA-рецепторов NASPM не подавлял Ca²⁺-ответ на DA в нейронах первой субпопуляции. Селективный агонист CP-KAR, ATPA, повышал [Ca²⁺]_i в той же степени, что и DA лишь в первой субпопуляции ГАМКергических нейронов. Ингибитор ГАМК(А)-рецепторов, бикукуллин, не повышал амплитуду Ca²⁺-ответа на DA в этой субпопуляции, что указывает на отсутствие CP-KARs в постсинаптической мембране, где локализованы ГАМК(А)-рецепторы. Таким образом, данную субпопуляцию ГАМКергических нейронов можно отнести к нейронам, содержащим CP-KARs, которые, вероятно, локализованы в пресинаптической мембране ГАМКергических нейронов. Повышение [Ca²⁺], во второй субпопуляции, вызванное аппликацией DA, полностью подавлялось ингибитором CP-AMPARs, NASPM. В этой же субпопуляции NASPM уменьшал амплитуду Ca²⁺-колебаний, указывая на участие CP-AMPARs в формировании Ca²⁺-импульса во время синхронной кальциевой активности. На основании этого данную субпопуляцию нейронов можно отнести к ГАМКергическим нейронам, содержащим CP-AMPARs. Большинство же нейронов в культуре клеток гиппокампа (70-85%) не окрашивались антителами против GAD65/67 и с задержкой отвечали на аппликацию DA повышением частоты кальциевых колебаний. Амплитуда этих колебаний в ответ на DA увеличивалась в присутствии NASPM в субпопуляции тормозных нейронов, содержащих CP-KARs, указывая на их иннервацию тормозными нейронами, содержащими CP-AMRARs. Это увеличение амплитуды Ca²⁺-колебаний в тормозных нейронах, содержащих CP-KARs, коррелировало с уменьшением амплитуды синхронной кальциевой активности в большой (42% ± 6% нейронов) субпопуляции глутаматергических нейронов, предполагая иннервацию последних тормозными нейронами, содержащими CP-KARs. Таким образом, ГАМКергические нейроны, содержащие СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы, могут работать в тандеме, контролируя активность отдельных популяций нейронов.

Ключевые слова: ГАМКергические нейроны, GluK1, GluA2, проницаемые для кальция каинатные и AMPA-рецепторы, синхронная активность, нейроглиальные культуры клеток гиппокампа **DOI:** 10.31857/S0233475520010107

введение

Глутаматные каинатные (КА) и АМРА-рецепторы классически рассматриваются как рецепторы-каналы, деполяризующие мембрану за счет натриевой проводимости, что обеспечивает прохождение возбуждающего сигнала через нейро-

Сокращения: АМРА – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; CP-AMPARs – Ca²⁺-проницаемые АМРА-рецепторы; NASPM – (1-нафтил)ацетил спермин, сслективный антагонист CP-AMPARs; DA – домоевая кислота; CP-KARs – Ca²⁺-проницаемые каинатные рецепторы; ATPA – (*RS*)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-*терет*-бутилизоксазол-4-ил)пропановая кислота, селективный агонист GluK1-содержащих каинатных рецепторов; CGP-35348 (3-аминопропил(ди-этоксиметил)фосфиновая кислота) – ингибитор ГАМК(В)-рецепторов; CKK – синхронные кальциевые колебания.

нальные синапсы, активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов и снятие магниевого блока с NMDA-рецепторов. Однако отдельные популяции КА- и AMPA-рецепторов обладают кальциевой проводимостью, что дает возможность участия в запуске процесса секреции нейротрансмиттеров [1].

Сведения о физиологических эффектах агонистов CP-KARs достаточно противоречивые, поскольку результат зависит от концентрации агонистов, типа и состояния нейронов. Так, активация CP-KARs может вызывать резкое усиление возбуждения в ответ на физиологические стимулы и увеличивать высвобождение глутамата [2, 3]. С другой стороны, агонисты СР-КА-рецепторов усиливают секрению ГАМК [4-6] и полавляют синаптическую передачу. Что касается селективной экспрессии субъединиц GluK1 и GluK2, определяющих Ca²⁺-проводимость KAR, то показано, что возбуждающие пирамидальные клетки экспрессируют главным образом GluK2-содержащие рецепторы, тогда как тормозные нейроны гиппокампа экспрессируют GluK1 [7, 8]. Причем CP-KARs, содержащие субъединицу GluK1, могут быть локализованы в пресинаптической мембране ГАМКергических нейронов [9, 10], где они стимулируют секрецию ГАМК [10-12] и, таким образом, осуществляют отрицательную обратную связь, ингибируя активность принципиальных нейронов при гипервозбуждении [5, 13]. Предполагается, что активация CP-KARs ГАМКергических нейронов может вызывать нейропротекторный эффект при ишемических повреждениях мозга и других нейродегенеративных процессах. В ряде работ показано, что, действительно, активация CP-KARs усиливает высвобождение ГАМК и увеличивает тоническое торможение пирамидальных нейронов [8, 14, 15], защищая их от повреждения при гипервозбуждении.

Исследование механизма, с помощью которого CP-KARs усиливают секрецию нейротрансмиттеров в ГАМКергических нейронах показало, что нейроны, содержащие CP-KARs, легковозбудимы, генерируют быстрый Ca²⁺-сигнал без десенситизации при активации селективными агонистами KARs [9, 10, 16] и не имеют ГАМК(А)рецептор-зависимого торможения [17]. При этом CP-KARs располагаются пресинаптически на данных нейронах. Такие свойства рецептора могут обеспечить опережающую и массивную секрецию ГАМК при возбуждении.

СР-АМРАRs локализованы в определенных подтипах ГАМКергических нейронов. Так, 78% быстроразряжающихся ГАМКергических нейронов (fast spiking), содержащих парвальбумин, содержат также и СР-АМРАRs [18]. В отличие от КАRs, СР-АМРАRs локализованы в тормозных интернейронах постсинаптически, где способствуют генерации Са²⁺-импульса, который вызывает секрецию ГАМК и торможение нейронов в сети [19-23]. CP-AMPARs играют большую роль в синаптической пластичности [24]. В ряде работ показано, что после периода повышенной активности количество CP-AMPARs в синапсе возрастает [25, 26]. Последние исследования показали, что соотношение Са²⁺-проводящих и Са²⁺-непроводящих АМРА-рецепторов зависит от активности синапса. При слабой стимуляции в синапсе активируется транспорт CP-AMPARs, а при сильной стимуляции активируется транспорт AMPARs, содержащих GluA2 [27]. Встраивание и удаление CP-AMPARs в синапсе регулируется процессами фосфорилирования и дефосфорилирования С-концевого домена субъединицы GluA1. Особенно интенсивно данный процесс протекает в постнатальтный период. Показано, что на 4-5-й день постнатального периода около 78% AMPARs в синапсах проницаемы для Ca²⁺ [28].

Ввиду важной регуляторной роли CP-KARs и CP-AMPARs в последние годы активизировались усилия по идентификации и характеристике нейронов, экспрессирующих эти рецепторы. В настоящее время устанавливаются электрофизиологические характеристики этих рецепторов, их локализация в определенных подтипах нейронов, пресинаптическая и постсинаптическая локализация, участие рецепторов в усилении секреции ГАМК, а также выясняется роль этих рецепторов в контроле гипервозбуждения.

В настоящей работе ставились следующие задачи: визуализировать ГАМКергические нейроны, содержащие СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы, по характерному Са²⁺-сигналу в ответ на агонисты соответствующих рецепторов; выявить различия в субпопуляциях ГАМКергических нейронов, содержащих СР-КА- и (или) СР-АМРА-рецепторы; установить пре- или постсинаптическую локализацию этих рецепторов в нейронах; выявить степень контроля активности СР-КА-рецепторов ГАМК(А)-рецепторами; определить популяции нейронов, иннервируемые нейронами, содержащими СР-КА и СР-АМРА-рецепторы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток гиппокампа. В экспериментах использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа крысы, выделенного из головного мозга новорожденных (1–3 дня) крыс Sprague–Dawley в соответствии с [29, 30]. Эксперименты проводили на культуре нейронов гиппокампа на 14–17-й день культивирования. Перед экспериментом клетки загружали в течение 30 мин при 28°C флуоресцентным зондом Fura-2 AM (6 мкМ) в растворе HBSS, содержащем (мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂,

10 глюкозу и 10 HEPES; pH 7.35. Флуоресценцию регистрировали в растворе Хенкса. Плотность клеток составляла 5000–7000/мм².

Для измерения [Ca²⁺], использовали систему анализа изображений на базе инвертированного моторизованного микроскопа Leica DMI6000B, оснащенного высокоскоростной монохромной ССД-камерой HAMAMATSU С9100, системой высокоскоростной смены возбуждающих светофильтров Leica's Ultra-Fast Filter Wheels (время переключения 10-30 мс). Использовали объектив Leica HC PL APO 20×/0.7 IMM. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель Leica EL6000 с ртутной лампой высокого давления HBO 103 W/2. Кальциевые сигналы нейронов регистрировали по интенсивности флуоресценции двухволнового Са²⁺-чувствительного зонда Fura-2. Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров FU2 (Leica, Германия) с фильтрами возбуждения ВРЗ40/30 и ВРЗ87/15, светоделителем FT410 и фильтром эмиссии BP510/84. Полученные в двух различных каналах временные серии изображений обрабатывали в программе ImageJ с использованием программных модулей Time Series Analyzer и RatioPlus. Амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток определяли из отношения интенсивности флуоресценции Fura-2 при возбуждении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности при возбуждении 380 нм.

Иммуноцитохимическое окрашивание ГАМКергических нейронов. Для обнаружения ГАМКергических нейронов использовали иммуноцитохимический метод [30, 31]. Поскольку измерения кальция и регистрацию флуоресценции антител проводили на разных микроскопах, то для совмещения изображений на обратную сторону круглого покровного стекла с культурой клеток тонким маркером наносили измерительную сетку с шагом 2 мм. В обоих микроскопах изображение сетки совмещалось с изображением перекрестия окуляра. После регистрации кальциевого сигнала клетки фотографировали в режиме фазово-контрастной микроскопии и каждую клетку нумеровали. Затем клетки фиксировали и анализировали иммуноцитохимически с использованием антител против глутамат декарбоксилазы (GAD65/67) согласно методике описанной ранее [32, 33]. Во время этой процедуры использовали следующие растворы: фосфатно-солевой буфер (PBS), рН 7.4: 4% параформальдегид в PBS: 1% и 10% сыворотку осла в PBS. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 20 мин и трижды промывали ледяным PBS в течение 5 мин. Для пермеабилизации клетки обрабатывали 0.1% раствором Тритона Х-100 в течение 15 мин. Для блокирования неспецифических сайтов связывания антител фиксированные клетки инкубировали в 10% сыворотке осла в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными кроличьими антителами против GAD 65/67 в течение 12 ч при 4°С (1 : 500 в 1% сыворотке осла). Фиксированные клетки затем промывали PBS (3 раза в течение 5 мин) и обрабатывали вторичными антителами осла против кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (1 : 200 в PBS) в соответствии с руководством производителя (Abcam, Великобритания). Для окрашивания ДНК в фиксированных клетках использовали ДНК-специфический флуоресцентный зонд Hoechst 33 342 [34].

Флуоресценцию антител регистрировали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Leica TCS SP5 при возбуждении He-Ne-лазером с длиной волны возбуждения 633 нм и регистрации при 655–700 нм. Для возбуждения Hoechst 33342 использовали лазер с длиной волны 405 нм. Регистрацию производили в диапазоне 425–500 нм. Затем с помощью программного обеспечения ImageJ сравнивали конфокальные изображения флуоресценции антител и прижизненные флуоресцентные изображения клеток, окрашенных Fura-2. Такой подход позволяет оценить изменения [Ca²⁺]_i в GAD65/67-положительных и в GAD65/67-отрицательных нейронах.

Материалы. В работе использовали: растворы Хенкса, HEPES (MP Biomedicals, США): Fura-2/AM. бессывороточную добавку В-27, бикукуллин, домоевую кислоту, ATPA, NASPM, (Tocris Bioscience, Великобритания); бычий сывороточный альбумин, PBS, (Sigma, США). Первичные кроличьи антитела против глутаматдекарбоксилазы 65 и 67 (Abcam, Великобритания), вторичные антитела осла против антител кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 647 (1: 200 в PBS) были приготовлены согласно прописи (Abcam, Великобритания). Реагенты добавляли при полной замене среды с помощью специальной перфузионной системы, которая позволяет быстро заменить весь раствор в камере. Скорость записи – 1 кадр в секунду. Все эксперименты выполнены при температуре 28-30°С.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM) или как репрезентативные записи кальциевых сигналов в отдельных клетках. Серия экспериментов одного дня состояла из 5–6 повторов. Каждый эксперимент с клетками одного посева повторяли 3 раза. Количество клеток, проанализированных в одном опыте, варьировало от 100 до 200. В подписях к рисункам указано: N – количество клеток, проанализированных в конкретном эксперименте, n – число независимых экспериментов. Исходный уровень сигнала в клетках обычно составлял 0.23 \pm 0.07 (здесь и далее приведено среднее значение \pm стандартное отклонение). Нейроны отличали от астроцитов по синхронной спонтанной

активности и быстрому Ca²⁺-ответу на деполяризацию 35 мМ KCl в конце эксперимента. Анализ результатов и построение графиков проводили с помощью программы Origin 9.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы визуализировать и охарактеризовать нейроны, содержащие CP-AMPARs и CP-KARs. мы регистрировали изменения концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле ([Ca²⁺]_i) во всех клетках в поле зрения микроскопа в культуре клеток гиппокампа на 14-17 DIV при действии агонистов и антагонистов этих рецепторов. Для исследования взаимодействия между популяциями клеток, в нейрональной сети индуцировали режим синхронных кальшиевых колебаний (СКК). Синхронную активность нейронов вызывали снятием ГАМК(А)-зависимого торможения ингибитором ГАМК(А)-рецепторов, бикукуллином [5]. DA использовали в качестве агониста обоих рецепторов. АТРА использовали в качестве селективного агониста CP-KAR [35]. NASPM использовали в качестве селективного антагониста CP-AMPAR [36]. На рис. 1а показано, что бикукуллин вызывает синхронные осцилляции [Ca²⁺]_і в нейронах. Кратковременная аппликация DA в концентрации 300 нМ ($EC_{50} = 51$ нМ) вызывала быстрое высокоамплитудное и продолжительное повышение базального уровня [Ca²⁺]_і в минорной популяции нейронов (кривые 1, 2 на рис.16) и через несколько секунд (15 с в данном эксперименте) увеличивала частоту СКК во всех остальных нейронах в сети (кривые 3, 4 на рис.16). Задержка возбуждения в большинстве нейронов может означать, что популяция нейронов, реагирующих быстрым подъемом [Са²⁺], содержит ГАМКергические нейроны, и их возбуждение тормозит остальные нейроны от возбуждения домоевой кислотой на какое-то время (15с), по прошествии которого ГАМК-зависимое торможение прекращается.

Торможение, по-видимому, реализуется через ГАМК(В)-рецепторы, поскольку ГАМК(А)-рецепторы заблокированы бикукуллином.

Для выявления нейронов, содержащих СР-АМРАRs, повторная аппликация DA проводилась на фоне ингибитора СР-АМРАRs, NASPM (рис 1*a*, 1*b*). По реакции на NASPM, популяция, ответившая на DA в контроле быстрым увеличением базального уровня $[Ca^{2+}]_i$, разделилась на две субпопуляции. NASPM полностью подавлял фазу быстрого повышения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на DA в одной субпопуляции (черная кривая 2 на рис. 1*b*). На основании этого эти клетки можно отнести к нейронам, содержащим СР-АМРАRs. Ранее было показано, что данный тип рецепторов локализован в постсинаптической мембране нейронов [19, 20]. В контрольных экспериментах амплитуда кальциевых ответов на повторную аппликацию DA сохранялась (не показано) [37]. Вклад других каналов (NMDA, потенциал-зависимых Na⁺- и Ca²⁺-каналов и каналов эндоплазматического ретикулума) в ответах на активацию CP-AMPARs ГАМКергических нейронов в культуре кортикальных нейронов крысы был исследован ранее [38]. Ca²⁺-сигнал, генерируемый CP-AMPA-рецепторами, существенно не изменялся в присутствии циклопиазоновой кислоты, антагонистов NMDA-рецепторов и блокаторов Na⁺- и Ca²⁺-каналов. Присутствие ингибиторов NMDA-рецепторов не изменяло количество нейронов, ответивших на DA [39].

Ингибитор CP-AMPARs не подавлял, а даже увеличивал Ca^{2+} -ответ на DA во второй субпопуляции нейронов (кривая *I*, рис. 1*в*). На рис. 1*г* красными кривыми представлены кальциевые сигналы этой субпопуляции нейронов в ответ на последовательную аппликацию DA и селективного агониста CP-KARs, ATPA. Показано, что ATPA повышает $[Ca^{2+}]_i$ в той же степени, что и DA, только в этой субпопуляции нейронов, обнаруживая рецептор, содержащий GluK1 субъединицу.

Ингибитор ГАМК(А)-рецепторов, бикукуллин, не повышал амплитуду Ca^{2+} -ответа на DA в этой популяции (рис. 1*г*), что указывает на отсутствие CP-KARs в постсинаптической мембране, где локализованы ГАМК(А)-рецепторы [17, 19]. Такая локализация CP-KARs обеспечивает отсутствие ГАМК(А)-рецептор-зависимого торможения этих рецепторов, что может способствовать высокой скорости возбуждения [17]. На основании полученных результатов можно предположить, что данная популяция нейронов содержит CP-KARs в пресинаптической мембране.

Таким образом, с помощью селективного агониста CP-KARs и антагониста CP-AMPARs удалось показать, что популяция нейронов, ответивших повышением [Ca²⁺]_i на аппликацию DA, состоит их двух субпопуляций нейронов, одна из которых содержит CP-KARs, а другая – CP-AMPARs.

Характерные кальциевые ответы на DA и на АТРА позволяют визуализировать нейроны, содержащие CP-KA- и CP-AMPA-рецепторы (рис. 1 ∂ , 1e, 1 ∞). На рисунках представлены флуоресцентные изображения клеток, окрашенных зондом на свободный кальций. Интенсивность флуоресценции пропорциональна [Ca²⁺]_i. На рис. 1 ∂ приведены изображения клеток на 535-й секунде эксперимента. Клетки находятся в состоянии покоя, темные пятна соответствуют клеткам с низкой [Ca²⁺]_i. На рис. 1e показано, что во всех нейронах на 545-й секунде эксперимента в максимуме импульса СКК [Ca²⁺]_i высокая (светлые нейроны). В темных клетках, представленных



Hoechst 33342

GAD 65/67

Наложение

Рис. 1. Идентификация ГАМКергических нейронов, содержащих СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы. *a* – Общая схема эксперимента. Кальциевые сигналы нейронов в режиме СКК в ответ на DA (300 нМ) в контроле (*б* – первая добавка в растянутой временной шкале) и в присутствии 50 мкМ NASPM (*в*) в четырех популяциях нейронов, представленных кривыми, усредненными по семи нейронам каждой популяции. *б*, *в* – Цифрами на кривых обозначены: *1* – тормозные нейроны, содержащие CP-KARs, *2* – тормозные нейроны, содержащие CP-AMPARs, *3*, *4* – возбуждающие нейроны.

e – Реакция нейронов на аппликацию агонистов КА-рецепторов: DA и ATPA вызывают повышение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах, в которых NASPM не ингибирует DA-индуцированный Ca^{2+} -ответ (красные кривые). Бикукуллин не увеличивает амплитуду Ca^{2+} -сигнала на DA в этой субпопуляции нейронов (красные кривые). Для сравнения показаны Ca^{2+} -сигналы в двух глутаматергических нейронах (зеленые кривые). Эти нейроны не отвечают на ATPA, а бикукуллин увеличивает в них амплитуду DA-индуцированного ответа. Пауза между аппликациями составляет 12 мин. N = 125, n = 3.

 ∂ , *е*, \mathcal{K} – Прижизненная визуализация нейронов, содержащих СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы; флуоресцентные изображения клеток, окрашенных Fura-2 в поле зрения микроскопа. ∂ – Клетки в состоянии покоя, темные пятна соответствуют клеткам с низким [Ca²⁺]_i. *е* – Увеличение [Ca²⁺]_i в нейронах зарегистрировано на 545-й секунде в максимуме импульса СКК на рис. 1*б* (светлые нейроны). Темные клетки – астроциты. \mathcal{K} – Светлые клетки-нейроны, содержащие СР-КАRs и СР-АМРАs. Момент регистрации кадра показан стрелочкой на рис. 1*б*.

з, *и*, κ – иммуноцитохимическое окрашивание клеток в культуре антителами против GAD 65/67. Слева – ядра клеток, окрашенные с помощью Hoechst 33342; в центре – флуоресценция антител против GAD 65/67, справа – объединенное изображение. 15% клеток окрашены антителами к GAD 65/67. 65% из них ответили на DA увеличением [Ca²⁺]_i. Отмеченные цифрами *1*, *2* клетки на рис. 1*и* соответствуют клеткам из семейств *1*, *2* на рис. 1*6*.

преимущественно астроцитами, $[Ca^{2+}]_i$ не повышается во время СКК. На рис. 1*ж* показано, что в период между импульсами, на 555-й секунде эксперимента (момент регистрации кадра показан стрелочкой на рис. 1*б*) остаются светлыми только нейроны, быстро реагирующие на DA повышением базального уровня $[Ca^{2+}]_i$. Последующее добавление ATPA визуализирует только нейроны, содержащие CP-KARs (не показано).

Обе популяции (светлые нейроны на рис. 1*ж*) оказались ГАМКергическими нейронами и положительно окрашивались антителами против глутаматдекарбоксилазы 65/67 (рис. 1*3*, 1*u*, 1*к*). На рис. 1*u* стрелочкой показаны две покрашенные антителами клетки, из субпопуляций 1, 2 на рис. 1*б*. Большинство же нейронов в культуре клеток гиппокампа (70–80%) не окрашивались антителами и на этом основании отнесены к глутаматергическим нейронам. Эти нейроны отвечают на аппликацию DA с задержкой и лишь повышением частоты СКК (кривые 3, 4 на рис. 1*б*).

Система анализа изображения (нейроимилжинг) позволяет анализировать одновременно сигналы от сотен нейронов. Сравнение этих сигналов позволяет обнаружить субпопуляции определенных подтипов нейронов и установить взаимодействие не только между отдельными нейронами, но и между субпопуляциями нейронов. Для выявления мишеней, иннервируемых нейронами, содержащими CP-KARs и CP-AMRARs, мы сравнивали не только изменения базального уровня [Ca²⁺]; в ответ на DA, но и амплитуды кальциевых импульсов при СКК в контроле и в присутствии антагониста СР-АМРА-рецепторов, NASPM. Все нейроны уверенно разделились на четыре субпопуляции, по-разному реагирующие на ингибитор CP-AMPARs. NASPM и на аппликацию DA в присутствии NASPM.

На рис. 2 представлены усредненные кальциевые сигналы семи репрезентативных клеток каждой субпопуляции из эксперимента, показанного на рис. 1*а*. Амплитуду колебаний $[Ca^{2+}]_i$ измеряли как в присутствии DA, так и после ее отмывки. Первые две субпопуляции на рис. 2 представляют ГАМКергические нейроны, которые ответили на DA быстрым увеличением базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2*a* и 2*b*). Третья и четвертая субпопуляции представляют глутаматергические нейроны (рис. 2*b* и 2*c*).

Можно видеть, что в тормозных нейронах первой группы, содержащих CP-KARs, амплитуда CKK, регистрируемая после удаления DA в контроле в среднем не изменяется и в присутствии NASPM (рис. 2*a*), что подтверждает отсутствие CP-AMPA-рецепторов в этих нейронах. Однако Ca²⁺-ответ на DA в присутствии NASPM не только сохраняется, но и значительно (в 2.5 раза) увеличивается (рис. 2*a*), что может указывать на иннервацию этих нейронов ГАМКергическими нейронами, содержащими CP-AMPARs. По-видимому, популяция ГАМКергических нейронов, содержащих CP-AMPARs, контролирует активность популяции ГАМКергических нейронов, содержащих CP-KARs, предохраняя их от повреждений, обусловленных быстрым, высокоамплитудным Ca²⁺-сигналом, который развивается в этих нейронах при гипервозбуждении.

В NASPM-чувствительных тормозных нейронах второй группы (рис. 26) амплитуда СКК, регистрируемая после удаления DA в контроле, в среднем уменьшается в присутствии NASPM, что указывает на участие CP-AMPARs в формировании импульса Ca²⁺ во время СКК в нейронах этой популяции. Амплитуда импульса уменьшается на 29 ± 2%. При аппликации DA в присутствии NASPM наблюдается значительное (в 3 раза) снижение амплитуды кальциевых колебаний в нейронах этой субпопуляции (рис. 26), по-видимому, за счет полного подавления фазы увеличения базального уровня [Ca²⁺]_i (см. рис. 16).

В NASPM-чувствительных глутаматергических нейронах третьей группы (рис. 2в) амплитуда кальциевых сигналов во время СКА, после удаления DA, и амплитуда ответов на аппликацию DA уменьшались в присутствии NASPM. Поскольку DA не вызывала увеличения базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в этой субпопуляции (кривая 3 на рис. 16), что предполагает отсутствие кальний-проводящих КА- или АМРА-рецепторов, а снижение активности глутаматергических нейронов этой популяции в присутствии NASPM коррелирует с повышением активности нейронов, содержащих CP-KARs, (рис. 2a), то можно предположить, что эффект подавления активности обусловлен иннервацией глутаматергических нейронов этой субпопуляции тормозными нейронами, содержащими CP-KARs.

В глутаматергических нейронах четвертой группы, нечувствительных к NASPM и не содержащих СР-КА- или СР-АМРА-рецепторов, амплитуда СКА не изменяется в присутствии NASPM, что подтверждает отсутствие СР-АМРАрецепторов. Кроме того, сохранение амплитуды кальциевых колебаний, индуцированных DA в присутствии NASPM, указывает на то, что нейроны этой субпопуляции заметно не иннервируются тормозными нейронами, содержащими СР-АМ-RARs или CP-KARs.

Таким образом, данный эксперимент показывает, что ГАМКергические нейроны, содержащие CP-AMPARs, иннервируют ГАМКергические нейроны, содержащие CP-KARs, которые, в свою очередь, контролируют активность значительной популяции глутаматергических нейронов.

Обычно тормозное действие ГАМК осуществляется через ГАМК(А)- и ГАМК(В)-рецепторы. Поскольку в нашем случае ГАМК(А)-рецепторы



Рис. 2. Изменение СКК и Ca²⁺-ответов на DA в присутствии ингибитора CP-AMPAR в четырех популяциях нейронов. Приведены ответы, усредненные по 7 нейронам из каждой популяции. Схема эксперимента показана на рис. 1*а*. В каждом блоке приведены: реакция нейронов на DA и последующие синхронные колебания кальция после отмывки DA (слева), и синхронные колебания кальция и реакция нейронов на DA в присутствии NASPM (справа). a - B ГАМКергических нейронах, содержащих CP-KARs, амплитуда СКК после удаления DA не изменяется в при-

сутствии NASPM. Значительное увеличение [Ca²⁺]_i в присутствии NASPM наблюдается во время аппликации DA (справа) по сравнению с контролем (слева), что может указывать на торможение этих нейронов нейронами, содержащими CP-AMPARs.

 δ – NASPM-чувствительные ГАМКергические нейроны. NASPM уменьшает амплитуду СКК после удаления DA в среднем на 29 ± 3%, а также значительно снижает амплитуду колебаний кальция при аппликации DA.

s – Глутаматергические нейроны, чувствительные к NASPM (42 ± 6% клеток). Амплитуда СКК после удаления DA и в ответ на DA уменьшаются в присутствии NASPM, что может указывать на ингибирование этих нейронов тормозными нейронами, содержащими CP-KARs, активность которых увеличивается в это время (см. рис. 2A).

e – NASPM-нечувствительные глутаматергические нейроны. (37 ± 6% клеток). Амплитуда СКК после удаления DA и в ответ на DA не изменяется в них в присутствии NASPM, что указывает на отсутствие иннервации со стороны нейронов, содержащих CP-AMPARs или CP-KARs.

заблокированы бикукуллином, то тормозное действие, по-видимому, развивается за счет взаимодействия ГАМК с ГАМК(В)-рецепторами. Ранее было показано, что за способность ГАМК подавлять СКК ответственны в основном метаботропные ГАМК(В)-рецепторы [40]. Для того чтобы показать участие ГАМК(В)-рецепторов в ингибировании СКК в присутствии ингибитора ГАМК(А)-рецепторов, мы провели следующий эксперимент. На рис. 3 показано, что СКК, индуцированные бикукуллином, подавляются ГАМК, что предполагает действие ГАМК через ГАМК(В)рецептор; отмывка ГАМК восстанавливает колебания. Добавление ГАМК в присутствии ингибитора ГАМК(В)-рецептора, ССР 35348, не подавляет колебания. Это подтверждает, что ингибирующее действие ГАМК в присутствии бикукуллина осуществляется через ГАМК(В)-рецептор.

DA всегда вызывает увеличение частоты СКК в нейронах в культуре (рис. 1), что указывает на их деполяризацию, по-видимому, из-за активации AMPA-рецепторов (средняя частота колебаний при этом увеличивается от 0.02 до 0.1 Гц). Однако в присутствии NASPM DA вызывает еще большее увеличение частоты СКК (до 0.3Гц на рис. 1*в*), что может указывать на иннервацию "пейсмекерных" нейронов ГАМКергическими нейронами, содержащими СР-АМРА-рецепторы.



Рис. 3. ГАМК (2 мкМ) ингибирует СКК в присутствии бикукуллина (10 мкМ) и не ингибирует в присутствии ингибитора ГАМК(В)-рецептора СGP 35348 (10 мкМ) и бикукуллина.

Таким образом, в культуре клеток гиппокампа крысы на 14-17 DIV визуализированы (по характерному быстрому, высокоамплитудному Ca²⁺ответу на агонисты КА- и АМРА-рецепторов), два подтипа ГАМКергических нейронов, содержащих СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы. Показано, что рецепторы могут быть локализованы в различных популяциях ГАМКергических нейронов. Эти нейроны иннервируют различные субпопуляции нейронов. Иннервация тормозных нейронов, содержащих CP-KARs, ГАМКергическими нейронами, содержащими CP-AMPARs, может представлять собой эффективную отрицательную обратную связь для ограничения повышенной активности нейронов, содержащих CP-KARs, при которой быстрый вход Ca²⁺ через CP-KARs может привести к перегрузке митохондрий кальцием и сопутствующей продукции активных форм кислорода [41].

ОБСУЖДЕНИЕ

Регистрация [Ca²⁺]_i при действии агонистов КА- и АМРА-рецепторов позволила визуализировать нейроны, содержащие СР-КА- и СР-АМРАрецепторы. Ранее было показано, что при развитии нейрональной сети в культуре, через несколько дней возникают СКК, которые в дальнейшем, с возрастом культуры, постепенно рассинхронизируются. Амплитуда Ca²⁺-осцилляций уменьшается и затем СКК прекращаются. Прекращение СКК обусловлено в основном усилением ГАМКергической системы, гиперполяризующей нейронымишени. Ингибиторы ГАМК(А)-рецепторов и вещества, деполяризующие мембрану, индуцировали СКК в этих условиях. В отличие от АТРА, который селективно активирует вход Са²⁺ через СР-КА-рецепторы, DA активирует все АМРАи КА-рецепторы. Поэтому, кроме повышения [Ca²⁺], в нейронах, содержащих СР-АМРА- и КАрецепторы, DA деполяризует нейроны, содержащие классические не проницаемые для кальция АМРА-рецепторы, что приводит к увеличению частоты СКК. Обе популяции нейронов, в которых DA повышала базальный уровень [Ca²⁺]_i, оказались ГАМКергическими нейронами, что подтверждает известные данные об экспрессии CP-KARs в тормозных нейронах гиппокампа [7, 8]. Повышение базального уровня [Ca²⁺]_і в тормозных нейронах при действии DA предшествует увеличению частоты СКК в остальных нейронах, что может быть связано с активацией секреции ГАМК тормозными нейронами вследствие быстрого повышения [Ca²⁺]_і. Поскольку в этих условиях ГАМК(А)-рецепторы заблокированы бикукуллином, то тормозное действие, по-видимому, проявляется за счет взаимодействия ГАМК с ГАМК(В)-рецепторами. Ранее было показано, что за способность ГАМК подавлять СКК ответственны в основном метаботропные ГАМК(В)рецепторы [40]. В эксперименте, представленном на рис. 3, мы подтвердили эти данные и показали, что СКК, индуцированные бикукуллином, останавливаются ГАМК, и этот эффект снимается ингибитором ГАМК(В)-рецепторов СGP 35348.

Нейроны, экспрессирующие СР-АМРА- и СР-КА-рецепторы, представляют различные популяции тормозных нейронов. Причем СР-АМРАрецепторы локализованы в постсинаптической [15, 17], а СР-КА-рецепторы, по-видимому, в пресинаптической мембране [9, 10, 16] этих нейронов. Таким образом, данные популяции ГАМКергических нейронов могут использовать различный механизм торможения нейронов-мишеней. В присутствии антагониста СР-АМРА-рецепторов, NASPM, изменялись как амплитуда, так и частота СКК как в контроле, так и в присутствии агониста КА-/АМРА-рецепторов, DA. Причем эти изменения были различны в разных субпопуляциях тормозных и возбуждающих нейронов. Прямое, ингибирующее действие NASPM на DA-индуцированное повышение [Ca²⁺]_i наблюдалось лишь в одной субпопуляции тормозных нейронов. В нейронах этой субпопуляции NASPM полностью подавлял повышение базального уровня [Ca²⁺], под действием DA и уменьшал амплитуду СКК в отсутствии DA, указывая на участие CP-AMRARs в этих процессах. Подавление активности тормозных нейронов, содержащих CP-AMRARs, ингибитором NASPM сопровождалось увеличением активности (амплитуды Ca²⁺-колебаний) другой субпопуляции тормозных нейронов, содержаших CP-KARs, что указывает на иннервацию ГАМКергических нейронов, содержащих CP-KARs, тормозными нейронами, содержащими CP-AMRARs. По нашим данным и данным литературы, нейроны, содержащие CP-KARs, являются быстроотвечающими [41], а возможное отсутствие десенситизации и различное сродство CP-KARs ГАМКергических нейронов к агонистам [42] могут обеспечить селективный, высокоамплитудный и длительный Ca²⁺-сигнал при активации глутаматом. Такие характеристики Ca²⁺-сигнала ГАМКергических нейронов способствуют эффективному подавлению гипервозбуждения в нейрональной сети. Однако такие свойства СР-КА-рецептора делают нейроны уязвимыми к перегрузке кальцием и требуют эффективного контроля, который, повидимому, осуществляют ГАМКергические нейроны, содержащие СР-АМРА-рецепторы. Последние, в свою очередь, могут быть защищены от повреждения при гипервозбуждении наличием кальций-связывающих белков в буферных концентрациях [31]. Известно, что быстроразряжающиеся (fast spiking) ГАМКергические нейроны, содержащие CP-AMPARs, также содержат парвальбумин [24].

Повышение амплитуды СКК и базального уровня [Ca²⁺], в тормозных нейронах, содержащих CP-KARs, при действии DA в присутствии NASPM сопровождалось сильным подавлением активности (амплитуды СКК) в большой популянии глутаматергических нейронов, что указывает на их иннервацию тормозными нейронами, содержащими CP-KARs. Причины отсутствия иннервации остальных принципиальных нейронов со стороны тормозных нейронов, содержащих СР-АМРА- или КА-рецепторы, нами не изучались. Таким образом, при развитии нейроглиальной культуры гиппокампа происходит самоорганизация нейрональной сети, при которой обнаруживаются взаимодействия между популяциями ГАМКергических нейронов, содержашими CP-KARs и CP-AMPARs, и популяцией возбуждающих нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При культивировании нейроглиальной культуры гиппокампа нейроны самоорганизуются в нейрональную сеть, в которой устанавливаются определенные взаимодействия между популяциями нейронов. Из полученных результатов следует, что для торможения гипервозбуждения в нейрональной сети может включаться отрицательная обратная связь, обусловленная усилением активности популяций ГАМКергических нейронов, содержащих СР-КА- и СР-АМРА-рецепторы. В отличие от Ca²⁺-непроницаемых КА- и АМРАрецепторов, регулирующих мембранный потенциал, функция СР-КА- и СР-АМРА-рецепторов, по-видимому, состоит в регуляции базального уровня [Ca²⁺]_i. Усиление секреции ГАМК под действием быстрого входа ионов Ca²⁺ через СР-КА-рецепторы обуславливает торможение большой популяции глутаматергических нейронов. Высокая начальная скорость Са²⁺-ответа нейронов, содержащих CP-KARs, может определяться более легкой возбудимостью этих нейронов и отсутствием ГАМК(А)-рецепторов на пресинаптической мембране [5]. Такой механизм снятия торможения с ГАМКергических нейронов может обеспечить более быструю, опережающую (глутамат) секрецию ГАМК этими нейронами. Высокая амплитуда Са²⁺-сигнала и отсутствие десенситизации CP-KARs также могут быть факторами, способствующими усилению секреции ГАМК. Таким образом, тандем двух популяций ГАМКергических нейронов, содержащих СР-КАи СР-АМРА-рецепторы, представляет собой механизм контроля активности нейронной сети при гипервозбуждении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки МОН Республики Казахстан (грант № АР05133528).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chávez A.E., Singer J.H., Diamond J.S. 2006. Fast neurotransmitter release triggered by Ca influx through AMPA-type glutamate receptors. *Nature*. 443 (7112), 705–708.
- Campbell S.L., Mathew S.S., Hablitz J.J. 2007. Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology*. 53 (1), 37–47.
- Lauri S.E., Delany C., Bortolotto Z.A., Ornstein P.L., Collingridge G.L. 2001. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptormediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology.* 41 (8), 907–915.
- Xu J., Liu Y., Zhang G.Y. 2008. Neuroprotection of GluK1-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by Src kinase. J. Biol. Chem. 283 (43), 29355–29366.
- Kononov A.V., Bal' N.V., Zinchenko V.P. 2012. Control of spontaneous synchronous Ca²⁺ oscillations in hippocampal neurons by GABAergic neurons containing kainate receptors without desensitization. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 6 (2), 215–220.
- Cobb S.R., Buhl E.H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. 1995. Synchronization of neuronal activity inhippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 378 (6552), 75–78.
- Cossart R., Esclapez M., Hirsch J.C., Bernard C., Ben-Ari Y. 1998. GluK1 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.* 1 (6), 470–478.
- BureauI., Bischoff S., Heinemann S.F., Mulle C. 1999. Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J. Neurosci.* 19 (2), 653–663.
- Sun H.Y., Bartley A.F., Dobrunz L.E. 2009. Calciumpermeable presynaptic kainate receptors involved in excitatory short-term facilitation onto somatostatin interneurons during natural stimulus patterns. *J. Neurophysiol.* **101** (2), 1043–1055.
- Caiati M.D., Sivakumaran S., Cherubini E. 2010. In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J. Neurosci.* **30** (5), 1750–1759.
- 11. Lerma J., Marques J. M. 2013. Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron*. **80** (2), 292–311.
- Cossart R., Tyzio R., Dinocourt C., Esclapez M., Hirsch J.C., Ben-Ari Y., Bernard C. 2001. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron.* 29 (2), 497–508.

- Туровская М.В., Туровский Е.А., Кононов А.В., Зинченко В. П. 2013. Кратковременная гипоксия вызывает селективную гибель ГАМКергических нейронов. Биол. vemбраны. 30 (5–6), 479–490.
- Christensen J.K., Paternain A.V., Selak S., Ahring P.K., Lerma J. 2004. A mosaic of functional kainate receptors in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 24 (41), 8986–8993.
- Jiang L., Xu J., Nedergaard M., Kang J. 2001. A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses. *Neuron.* 30 (2), 503–513.
- Sakha P., Vesikansa A., Orav E., Heikkinen J., Kukko-Lukjanov T.K., Shintyapina A., Franssila S., Jokinen V., Huttunen H.J., Lauri S.E. 2016. Axonal Kainate Receptors Modulate the Strength of Efferent Connectivity by Regulating Presynaptic Differentiation. *Front. Cell Neurosci.* 10 (3).
- Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Теплов И.Ю, Косенков А.М. 2017. Торможение спонтанной синхронной активности нейронов гиппокампа возбуждением ГАМКергических нейронов Биологические мембраны, 34(4), 284–297.
- Wang H.X., Gao W.J. 2010. Development of calciumpermeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex. J. Physiol. 588, 2823–2838.
- Bochet P., Audinat E., Lambolez B., Crepél F., Rossier J., Iino M., Tsuzuki K., Ozawa S. 1994. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron.* 12, 383–388.
- Albuquerque C., Engelman H.S., Lee C. J., MacDermott A.B. 2001. Detection of neurons expressing calcium- permeable AMPA receptors using kainate-induced cobalt uptake. In: *Ion Channel Localization: Methods in Pharmacology and Toxicology*. Eds. Lopatin A., Nichols C.G. Humana Press, p. 297–309.
- Amakhin D.V., Soboleva E.B., Ergina J.L., Malkin S.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V. 2018. Seizure-induced potentiation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the entorhinal cortex. *Front Cell Neurosci.* 12, 486.
- Buldakova S.L., Kim K.K., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. 2007. Selective blockade of Ca²⁺ permeable AMPA receptors in CA1 area of rat hippocampus. *Neuroscience*. 144 (1), 88–99.
- Chen T., Wang W., Dong Y.L., Zhang M.M., Wang J., Koga K., Liao Y.H., Li J.L., Budisantoso T., Shigemoto R., Itakura M., Huganir R.L., Li Y.Q., Zhuo M. 2014. Postsynaptic insertion of AMPA receptor onto cortical pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex after peripheral nerve injury. *Mol. Brain.* 7, 76.
- 24. Asrar S., Zhou Z., Ren W., Jia Z. 2009. Ca²⁺ Permeable AMPA receptor induced long-term potentiation requires PI3/MAP kinases but not Ca/CaM-dependent kinase II. *PLoS ONE*. **4** (2), e4339.
- Plant K., Pelkey K.A., Bortolotto Z.A., Morita D., Terashima A., McBain C.J., Collingridge G.L., Isaac J.T.R. 2006. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* 9, 602–604.

- Yang Y., Wang X-B., Frerking M., Zhou Q. 2008. Delivery of AMPA receptors to perisynaptic sites precedes the full expression of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 11388–11393.
- Purkey A.M., Woolfrey K.M., Crosby K.C., Stich D.G., Chick W.S., Aoto J, Dell'Acqua M.L. 2018. AKAP150 palmitoylation regulates synaptic incorporation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to control LTP. *Cell Rep.* 25 (4), 974–987.
- Lujan B., Dagostin A., von Gersdorff H. 2019. Presynaptic diversity revealed by Ca²⁺-permeable AMPA receptors at the calyx of held synapse. *J. Neurosci.* **39** (16), 2981–2994.
- Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.V., Tankanag A., Zinchenko V.P. 2015. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? *PLoS ONE*. 10 (7), e0134145.
- Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Kononov A.V., Zinchenko V.P. 2014. Short-term hypoxia induces a selective death of GABAergic neurons. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 8 (1), 125–135.
- Туровский Е.А., Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Туровская М.В. 2017: Кальций-проводящие белки защищают ГАМКергические нейроны гиппокампа от гипоксии и ишемии *in vitro. Биол. мембраны.* 34 (5), 68–80.
- Kapuscinski J. 1995. DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* 70 (5), 220–233.
- Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Mal'tseva V.N., Zinchenko V.P., Turovsky E.A. 2019. Taxifolin protects neurons against ischemic injury in vitro via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 96, 10–24.
- Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Kononov A.V., Zinchenko V.P. 2013. Short-term episodes of hypoxia induce posthypoxic hyperexcitability and selective death

of GABAergic hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* **250**, 1–7.

- 35. Clarke V.R., Ballyk B.A., Hoo K.H., Mandelzys A., Pellizzari A., Bath C.P., Thomas J., Sharpe E.F., Davies C.H., Ornstein P.L., Schoepp D.D., Kamboj R.K., Collingridge G.L., Lodge D., Bleakman D. 1997. A hippocampal GluK1 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*. 389 (6651), 599–603.
- Koike M., Iino M, Ozawa S. 1997. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 29 (1), 27–36.
- Кононов В.А., Баль Н.В., Зинченко В.П. 2011. Вариабельность кальциевых ответов нейронов гиппокампа на агонисты глутаматных рецепторов. Биол. мембраны. 28 (2), 127–136.
- Fischer W., Franke H., Scheibler P., Allgaier C., Illes P. 2002. AMPA-induced Ca²⁺ influx in cultured rat cortical nonpyramidal neurones: pharmacological characterization using fura-2 microfluorimetry. *Eur. J. Pharmacol.* 438(1–2), 53–62.
- Kosenkov A.M., Teplov I.Y., Sergeev A.I., Maiorov S.A., Zinchenko V.P, Gaidin S.G. 2019. Domoic acid suppresses hyperexcitation in the network due to activation of kainate receptors of GABAergic neurons *Arch. Biochem. Biophys.* 671, 52–61.
- Mann E. O., Paulsen O. 2007. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* 30 (7), 343–349
- Carriedo S.G., Yin H.Z., Sensi S.L., Weiss J.H. 1998. Rapid Ca²⁺ entry through Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels triggers marked intracellular Ca²⁺ rises and consequent oxygen radical production. *J. Neurosci.* 18 (19), 7727–7738.
- 42. Braga M.F., Aroniadou-Anderjaska V., Xie J., Li H. 2003. Bidirectional modulation of GABA release by presynaptic glutamate receptor 5 kainate receptors in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 23 (2), 442–452.

Visualization, Properties, and Functions of GABAergic Hippocampal Neurons Containing Calcium-Permeable Kainate and AMPA Receptors

V. P. Zinchenko^{1, *}, S. G. Gaidin¹, I. Yu. Teplov¹, A. M. Kosenkov¹, A. I. Sergeev¹, L. P. Dolgacheva¹, S. T. Tuleuhanov²

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia ²Al-Farabi Kazakh national University, Almaty, 050040 Kazakhstan *e-mail: vpz@mail.ru

Calcium-permeable kainate (CP-KAR) and AMPA-receptors (CP-AMPARs) of the brain neurons are active participants of plasticity and neurotransmitter release onset. In this paper, Ca^{2+} -permeable kainate (KA)and AMPA-receptors were identified in hippocampal neuroglial culture on 14–17 day in vitro (DIV) by the characteristic Ca^{2+} response to selective agonists and antagonists of these receptors, domoic acid (DA), and selective CP-KAR agonist, ATPA. It was shown that DA at a concentration of 300 nM caused a rapid increase of the intracellular Ca^{2+} concentration $[Ca^{2+}]_i$ in two minor subsets of neurons. Both subsets were found to be GABAergic neurons that were positively stained with antibodies against glutamate decarboxylase 65 and 67 (GAD65/67). The CP-AMPA receptor inhibitor, NASPM, did not suppress Ca^{2+} response to DA in the neurons of the first subset. The selective agonist CP-KAR, ATRA, increased $[Ca^{2+}]_i$ to the same degree as DA only in the first subset of GABAergic neurons. GABA(A) receptor inhibitor, bicuculline, did not increase the amplitude of Ca^{2+} response to DA in this subset, indicating the absence of CP-KARs in the postsynaptic

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ

rons containing CP-KARs, which are mainly localized in the presynaptic membrane of the GABAergic neurons. The $[Ca^{2+}]_i$ increase caused by the DA application in the second subpopulation, was completely suppressed by NASPM, the inhibitor of CP-AMPARs. In the same population NASPM reduced the amplitude of Ca^{2+} oscillations, indicating the involvement of CP-AMPARs in the Ca^{2+} pulse formation during synchronous calcium activity. For this reason, these neurons can be attributed to GABAergic neurons containing CP-AMPARs. Most of the neurons in the hippocampal cell culture (70-85%) were not stained with antibodies against GAD65/67 and responded to the DA with a delay by increasing the frequency of calcium oscillations. The amplitude of DA-induced oscillations increased in the presence of NASPM in the inhibitory neurons containing CP-KARs, indicating their innervation by inhibitory neurons containing CP-AMRARs. This increase in the Ca^{2+} oscillations amplitude in inhibitory neurons containing CP-KARs correlated with a decrease in the amplitude of synchronous calcium activity in a large ($42 \pm 6\%$ of cells) subset of glutamatergic neurons, suggesting innervation of the latter by inhibitory neurons containing CP-KARs. Thus, GABAergic neurons containing CP-KARs and CP-AMPARs can work in tandem, controlling the activity of individual neurons subpopulations.

Keywords: GABAergic neurons, GluK1 subunit, GluA2 subunit, Ca^{2+} -permeable kainate receptors, Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, synchronous activity, neuroglial hippocampal cell cultures

УДК 592,591.88,591.48,57.044

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СЕРОТОНИНА В МЫШЕЧНОЙ ФУНКЦИИ У ПЛАНАРИЙ

© 2020 г. Н. Д. Крещенко*

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 обл., 142290 Россия

> *e-mail: nkreshch@rambler.ru Поступила в редакцию 16.04.2019 г. После доработки 15.05.2019 г. Принята к публикации 16.05.2019 г.

В настоящей работе с помощью иммуноцитохимического и гистохимического методов и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии продемонстрировано близкое расположение периферических серотонинергических нервных элементов и мускулатуры тела у планарий *Polycelis tenuis, Schmidtea mediterranea* и *Girardia tigrina*. Такая локализация серотонинергических нейронов и их волокон свидетельствует о важной роли серотонина в регуляции мышечной функции у планарий. В ходе изучения механизмов мышечного сокращения у планарий было обнаружено, что деполяризация, вызванная высокой концентрацией ионов калия (15–100 мМ), а также серотонин ($10^{-4}-10^{-9}$ М), индуцировали сокращения изолированных мышечных волокон планарий *Procerodes littoralis*. Дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов – никардипин, нитрендипин и нифедипин – подавляли калий- и серотонин-индуцированные мышечные сокращения, что указывает на зависимость сокращения от внеклеточного кальция. Тапсигаргин и циклопиазоновая кислота существенно уменьшали число клеток, сокращающихся в ответ на введение ионов калия, но не оказывали влияния на индукцию мышечного сокращения серотонином. Таким образом, сокращение, вызванное серотонином, не зависело от внутриклеточного кальция. Результаты свидетельствуют о наличии разнообразных рецепторов и ионных каналов, опосредующих мышечное сокращение у планарий.

Ключевые слова: планарии, мускулатура, серотонин, рецепторы, флуоресцентная микроскопия **DOI:** 10.31857/S0233475520010065

ВВЕДЕНИЕ

У свободноживущих плоских червей турбеллярий (или планарий) мускулатура поддерживает форму тела, а также принимает участие в различных видах двигательной активности: перемещении, плавании, поиске добычи и ее захвате, осуществлении репродуктивного поведения. Планарии также используют мускулатуру для поглощения пищи с помощью мускулистой глотки. Планарии, обладая выдающейся регенерационной способностью, используются при изучении процессов регенерации и бесполого размножения, являются важным объектом в биологии стволовых клеток [1, 2]. В дополнение к этому, планарии являются удобной моделью для изучения механизмов мышечного сокращения, а также поиска новых антипаразитарных препаратов [3].

Серотонин (или гидрокситриптамин, 5-НТ) относится к биогенным аминам и является широко распространенным в животном мире низкомолекулярным азотистым соединением [4]. Он обнаружен у животных из разных таксономических групп – млекопитающих, ракообразных, насекомых, моллюсков, червей [5–7]. Серотонин как нейротрансмиттер регулирует у позвоночных животных чувство голода, температуру тела, болевую чувствительность, а также модулирует настроение, возбуждение, сексуальное поведение, выделение гормонов, играет роль в иммунном ответе [8-10]. Среди многочисленных свойств серотонина выделяется его возбуждающее действие на мускулатуру тела. Известно, что у млекопитающих серотонин вызывает сокращение гладкой мускулатуры кишечника, матки, бронхов, сосудов, регулирует сократительную функцию скелетной мускулатуры [9–13]. Он также регулирует сокращение мускулатуры кишечника у насекомых [14]. Однако у большинства беспозвоночных животных наличие серотонина и его функциональная роль изучены недостаточно.

Среди Platyhelminthes наиболее исследованными являются паразитические виды, относящиеся к классам трематод, цестод и моногеней, поскольку они имеют экономическое и медицинское значение. Многие виды трематод и цестод, являясь паразитами человека и сельскохозяйственных животных, причиняют серьезный вред здоровью людей и существенный экономический ущерб хозяйственной деятельности (животноводству, птицеводству, рыбному хозяйству). Серотонин был обнаружен в нервной системе паразитических червей Schistosoma mansoni, Hymenolepis diminuta, Moniezia expansa, Mesocestoides vogae, Aspidogaster conchicola, Opisthiogliphe ranae и других видов [15, 16]. Свободноживущие представители плоских червей – планарии – в этом отношении наименее изучены.

В настоящей работе изучали пространственное расположение серотонинергических нервных клеток и миофиламентов планарий в рамках исследования гипотезы о регуляторной роли серотонина в функционировании их мускулатуры. Проведены иммуногистохимические и физиологические исследования, позволяющие пролить свет на роль серотонина в мышечном сокращении у планарий. Выявлено тесное пространственное взаимодействие серотонинергических нейронов и их отростков с мускулатурой тела планарий *Polycelis tenuis, Schmidtea mediterranea* и *Girardia tigrina*. Показано, что серотонин, так же как избыток ионов калия (K⁺), индуцирует сокращение мускулатуры планарий *Procerodes littoralis*.

Проведенные исследования представляют теоретический и практический интерес: они раскрывают некоторые регуляторные механизмы возбуждения и сокращения мускулатуры у планарий. Полученные сведения могут быть использованы при разработке новых антипаразитарных препаратов, мишенью действия которых является мускулатура паразитических червей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения серотонина в нервной системе планарий использовали виды: Polycelis tenuis, Schmidtea mediterranea и Girardia tigrina. Исследования проводили в ИБК РАН (г. Пущино, Россия). Физиологические исследования проведены на планариях Procerodes littoralis в Королевском университете г. Белфаст, Великобритания. Для гистохимического выявления мускулатуры и иммуноцитохимического определения серотонинергических нервных компонентов готовили замороженные срезы (*P. tenuis*, *S. mediterranea*) и тотальные препараты (G. tigrina) планарий длиной 9-10 мм. Образцы фиксировали 4% параформальдегидом (MP Biomedicals, США) в 0.1 М фосфатном буфере (PBS, pH 7.4; Helicon, Россия) в течение 4 ч при комнатной температуре, последующие процедуры проводили при 4°С. Для приготовления тотальных препаратов образцы промывали PBST, содержащем PBS с добавлением 0.3% Тритона X-100 (Sigma), 0.1% азида натрия и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Amresco, США). Затем образцы помещали на 48 ч в раствор первичных поликлональных (whole serum) кроличьих неконъюгированных антител к серотонину (Immunostar, США, кат. № 20080, концентрация 1 : 500; или Sigma, США, кат. № 5545, концентрация 1 : 1000), промывали в PBS и инкубировали в среде, содержащей вторичные FITС-конъюгированные свиные анти-кроличьи антитела (Daco, Дания, кат. № F-025, разведение 1:40,48 ч) или вторичные козьи анти-кроличьи конъюгированные с Alexa Fluor488 антитела (Molecular Probes, США, кат. № А1108, развеление 1:100, 48 ч). Для приготовления замороженных срезов фиксированный материал помещали в 10% раствор сахарозы (Helicon, Россия) на 3–5 сут, после чего на криотоме Shandon Crvomatrix (Termoelectron Corporation, США) при температуре -18...-20°С готовили замороженные срезы с помощью заливочной среды Tissue Tek (Tissue Tek, США). Срезы собирали на обработанные поли-L-лизином предметные стекла (Polysine, Menzel-Glaser, Германия), высушивали на воздухе 1 ч и хранили при -20°С. Перед окраской препараты промывали в PBST (3 раза по 5 мин в горизонтальном положении) и окрашивали во влажной камере при 4°С антителами к серотонину (Іттиnostar, США, 1: 1000 или Sigma, 1: 1000) в течение 48 ч. После промывки в PBS (3 × 5 мин) препараты помещали во вторичные иммуноглобулины (Daco, Дания, 1:50) на 24 ч и снова промывали в PBS (3 × 5 мин). Для идентификации мускулатуры тела препараты докрашивали TRITC-(тетраметилродамин изотиоцианат)-меченым фаллоидином (Sigma, 1: 200) в течение 6-12 ч. Окончательно препараты промывали PBS, заключали в 75% раствор глицерина (Helicon, Россия) и накрывали покровным стеклом.

Отрицательный контроль включал: (1) инкубацию образцов в растворе без первичных антител и (2) использование неиммунной сыворотки вместо иммунной.

Микроскопия. Готовые окрашенные срезы изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 В (Leica Mycrosystems, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica Mycrosystems, Германия) в Центре коллективного пользования ПНЦБИ РАН (Пущино). Для анализа использовали фильтры проходящего света (BF), а также возбуждающего света с длиной волны в 450–490 нм (I3) для флуорохрома FITC (fluorescein isothiocyanate) и Alexa488, и с длиной волны 515–560 нм (N2.1) для локализации флуорохрома TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate).

Тотальные препараты планарий анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Mycrosystems, Германия). Микрофотографии с конфокального лазерного сканирующего микроскопа представлены в виде суммарной проекции от 12-32 последовательных оптических срезов, полученных при сканировании через толщину тканей в 30-60 мкм и суммированных (при необходимости получения суммарного изображения) с максимальной интенсивностью флуоресценции при помощи программы анализа изображений, прилагаемой к конфокальному микроскопу. Микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов, сохраняли в виде файлов в формате TIFF. Размеры изображений варьировали в зависимости от микроскопа и увеличения (например, от 1024 × 1024 до 4096 × 4096 пикселей). Для анализа использовали по 5-7 препаратов каждого вида планарий.

Физиология. Для изучения мышечного сокращения были использованы изолированные мышечные волокна планарий. Метод выделения индивидуальных мышечных волокон у паразитических червей успешно применялся ранее [17]. Мышечные волокна получали с помощью энзиматического расщепления. Из 25 особей (P. littoralis) с помощью тонкого скальпеля готовили гомогенат тканей, который помещали в инкубационную среду (ИС), содержащую 13.6 мМ CaCl₂, 13.4 мМ KCl, 458 мМ NaCl, 9.8 мМ MgCl₂ · 6H₂O, 13.6 мМ Na₂SO₄, 10 мМ Hepes, 10 мМ *D*-глюкозы; и 1% раствора антибиотка/антимикотика (Gibco-BRL, Великобритания), в который добавляли: 0.11 мг/мл коллагеназы (type 1A, из Clostridium hystoliticum, Sigma), 0.15 мг/мл протеазы (type XIV, из Streptomyces griseus, Sigma), и 0.15 мг/мл дитиотреитола (dithiothreitol, Sigma) и оставляли на 12 ч при 4°С.

Полученную смесь тканевых фрагментов и среды перемешивали на магнитной мешалке 10 мин и бережно пропускали через тонкий кончик пипетки. Суспензию помещали в 15 мл пробирки (Falcon) и центрифугировали при 28 g в течение 5 мин (при 4°C). Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в инкубационной среде, не содержащей ферментов, в течение 15 мин (4°C). После этого суспензию мышечных клеток распределяли в 50-мм чашки Петри (Falcon) по 3 мл в каждую, и оставляли при 4°C на 30–90 мин для исследования.

Микроперфузионная система, соединенная с инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TE200 (Япония) использовалась для визуального наблюдения мышечного сокращения. Под микроскопом с помощью инжектора и тонкой стеклянной микропипетки (диаметр кончика 5 мкм) исследуемое вещество вводили в непосредственной близости к мембране мышечной клетки. Ответы на ввеление вещества исслеловали в свежеприготовленной культуре мышечных клеток планарий. Сокращение мышечного волокна наблюдали на экране монитора, соединенного с микроскопом. Данные представлены в виде процента мышечных волокон, сокращающихся в течение 30 с после введения тестируемого вещества. Во всех экспериментах использовали только неподвижные - спонтанно не сокращающиеся мышечные клетки. Перед использованием тестируемого вещества проводили аппликацию инкубационной среды без добавок (негативный контроль); после аппликации тестируемых веществ на клетки подавалась среда с высоким (20 мM) содержанием ионов калия (K⁺) (положительный контроль).

В олной серии опытов использовали сто случайно выбранных мышечных клеток, взятых из четырех чашек Петри. Опыты повторяли по крайней мере 3 раза. Изучали действие серотонина (Sigma) и среды с высоким содержанием ионов калия (К⁺, 15–90 мМ) в сочетании с избранными антагонистами ионных каналов. Для исследования роли внеклеточного кальция в мышечном сокращении использовали блокаторы кальциевых каналов – никардипин, нитрендипин, нифедипин (дигидропиридины), а также метоксиверапамил и дилтиазем (все вещества в концентрациях 10 и 100 мкМ). Для изучения участия внутриклеточного кальция в серотонин-индуцируемом мышечном сокращении использовали ингибиторы Ca²⁺-ATP-азы саркоплазматического ретикулума – циклопиазоновую кислоту и тапсигаргин.

Во всех случаях антагонисты добавляли в чашки Петри за 10 мин до начала опыта (тестирования). Для статистической обработки результатов использовали *t*-тест Стьюдента. Результаты физиологических исследований были ранее частично опубликованы в виде тезисов докладов [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистохимическое и иммуноцитохимическое исследование

Мускулатура. У планарий *S. mediterranea*, *P. tenuis* и *G. tigrina* окраска фаллоидином была обнаружена в мускулатуре стенки тела (рис. 1a, 1δ), а также в специализированных органах (кишечник, глотка, рис. 1e, 1e) и репродуктивной системе планарий *P. tenuis*, размножающихся половым способом. Стенка тела планарий состоит из наружных кольцевых (рис. 1a, короткие толстые стрелки) и внутренних продольных мышечных волокон (рис. 1a, длинные тонкие стрелки), составляющих компактно упакованные слои мышц. Между ними расположены немногочис-


Рис. 1. Гистохимическая окраска мускулатуры тела планарий *Girardia tigrina* (*a*), *Schmidtea mediterranea* (*б*) и *Polycelis tenuis* (θ , z): кольцевые (короткие толстые стрелки, продольные (длинные тонкие стрелки) и диагональные (острия стрелок) мышечные волокна стенки тела планарий (a, b); мускулатура глотки (гл, длинные стрелки; пг – полость глотки) и якорные мышцы (ям) глотки (θ , короткие стрелки); мускулатура кишечника (z) – кольцевые волокна (длинные стрелки, пк – полость кишечника), и вверху мышечные волокна, соединяющие брюшную и спинную стороны тела планарии (острия стрелок). a – Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. $b-z - \Phi$ луоресцентная микроскопия. Масштаб: a - 50 мкм, b - 40 мкм, θ , z - 100 мкм.

ленные и неплотно расположенные диагональные мышечные волокна (рис. 1а и 1б, острия стрелок). Поперечные мышечные тяжи, состоящие из нескольких волокон, соединяют спинную и брюшную стенки тела. Дорзо-вентральные мышечные волокна расположены более или менее равномерно и пронизывают все тело планарии (рис. 1г, острия стрелок). Мускулатура глотки (рис. 1в, длинные стрелки), имеющая форму трубки, расположенной в центральной части туловища, представлена кольцевыми и продольными мышечным слоями. Обнаружены мышцы, расположенные у основания глотки и прикрепляющие глотку к мускулатуре тела планарии якорные мышцы глотки (рис. 18, короткие стрелки). Окраска фаллоидином выявлена в тонких мышечных филаментах, окаймляющих ветви слепого кишечника планарий. Мускулатура кишечника содержит, по крайней мере, кольцевые

(рис. 1*г*, длинные стрелки), а также продольные мышечные волокна (не показано).

Серотонин. У планарий S. mediterranea и P. tenuis положительная окраска на серотонин обнаружена в нейронах и волокнах центральной нервной системы: головном ганглии, нервных стволах, отходящих от головного ганглия, и простирающихся вдоль боковых сторон тела, а также в поперечных комиссурах, соединяющих нервные стволы. Серотонинергические нервные компоненты описаны также в центральной нервной системе планарий G. tigrina [19]. В настоящем исследовании продемонстрировано обилие серотонинергических нервных элементов – нейронов (рис. 2а, 2*в*, 2*г*, острия стрелок) и их волокон (рис. 2*a*, 2*б*, 2г, тонкие стрелки) в периферических отделах нервной системы у трех исследованных видов планарий: S. mediterranea, P. tenuis и G. tigrina. Xaрактерной особенностью локализации серотони-



Рис. 2. Иммуноцитохимическая окраска к серотонину (зеленым) и гистохимическая окраска мускулатуры (красным) у планарий *Girardia tigrina (a), Schmidtea mediterranea (б)* и *Polycelis tenuis (в, г)*. Серотонинергические нервные волокна (тонкие стрелки) и тела нейронов (острия стрелок) в непосредственной близости к мышечным волокнам. *a* – Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. *б*–*г* – Флуоресцентная микроскопия. Масштаб: *a* – 40 мкм; *б* – 50 мкм; *в* – 200 мкм; *г* – 100 мкм.

нергических нервных элементов в периферических отделах нервной системы планарий оказалось их расположение вблизи мышечных волокон (рис. 2a, 2δ). Такое расположение серотониновых нейронов и их волокон может свидетельствовать об участии биогенного амина серотонина в регуляции мышечной функции у планарий.

Физиологические исследования. Чтобы проверить предположение об участии серотонина в регуляции мышечной функции, были проведены физиологические исследования влияния серотонина на изолированные мышечные волокна, выделенные у планарий *P. littoralis*. Обнаружено, что ионы калия в высокой концентрации, а также серотонин вызывали сокращение мышечных волокон планарий (рис. 3a, 3b). Избыток ионов калия в среде (K⁺), начиная с концентрации 15 мМ, вызывал сокращение мышечных клеток (около 20%), в концентрации 40 мМ K⁺ индуцировал сокращение около 80% мышечных волокон, при

концентрациях ионов калия в диапазоне 40—80 мМ кривая сокращений выходила на плато (рис. 3*a*). Никардипин в концентрациях 10 и 100 мкМ, а также нитрендипин и нифедипин в концентрации 100 мкМ уменьшали число клеток, сокращающихся в ответ на высокую концентрацию ионов калия (табл. 1). Данные подтверждают наличие ионных кальциевых каналов на мембране мышечной клетки планарий.

Серотонин вызывал сокращение мышечных волокон планарий *P. littoralis* в дозозависимой манере (рис. *36*) в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-9} М, при его введении вблизи мембраны клетки. Дигидропиридиновые блокаторы кальциевых (Ca²⁺) каналов L-типа существенно (p < 0.001) уменьшали число мышечных клеток, сокращающихся в ответ на введение серотонина (рис. 4); порядок ингибирующей активности был следующим: никардипин > нитрендипин > нифедипин. Дилтиазем, бензотиазепиновый блокатор Ca²⁺ каналов, в

a

K+

90

75

60

45

30

15

0

15

30

45

60

75

% сокращений



-6

5

-3

Рис. 3. Физиология мышечного сокращения у планарий Procerodes littoralis. a – Зависимость интенсивности мышечного сокращения от концентрации ионов калия (в мМ, ось абсцисс); процент сокращений мышечных волокон (ось ординат), в каждой точке графика число повторов N равно от 4 до 20 для разных точек графика, число клеток в серии $n = 100. \, \delta$ – Кривая зависимости мышечного сокращения (ось ординат) от десятичного логарифма концентрации серотонина (5-НТ) (ось абсцисс); число повторных опытов N равно от 6 до 16 для разных точек графика, число клеток в одной серии n = 100. Разбросы (везде) — стандартное отклонение.

90

30

15

0

-10

-9

-8 -7

концентрациях 10 мкМ и 100 мкМ не оказывал существенного влияния на индуцированное серотонином мышечное сокращение. Метоксиверапамил (10 и 100 мкМ), фенилалкиламиновый блокатор Ca²⁺ каналов, не подавлял серотонининдуцированные сокращения мышечных клеток планарий (рис. 4). Тапсигаргин и циклопиазоновая кислота (10^{-4} — 10^{-8} M) значительно уменьшали число мышечных волокон, сокращающихся в ответ на высокую концентрацию калия (30 мМ, рис. 5а), но не оказывали существенного влияния

(в концентрации 10^{-5} и 10^{-7} М) на серотонин-индуцированное мышечное сокращение (рис. 56).

ОБСУЖЛЕНИЕ

Разработка гистохимической методики идентификации актиновых филаментов с помошью токсина из бледной поганки Amanita phalloides – фаллоидина, способного необратимо связываться с фибриллярным актином мышечной клетки, привела к существенному прогрессу в исследова-

Таблица 1. Процент сокращений изолированных мышечных волокон планарий *P. littoralis* в ответ на введение раствора с высоким содержанием ионов калия (30 мМ K⁺) после предварительной инкубации клеток с блокаторами кальшиевых каналов

Блокатор	Концентрация блокатора, М	Процент сокращений мышечных волокон ± SE	Число опытов N
Контроль (30 мМ К ⁺)	_	64.4 ± 2.44	9
Никардипин	10^{-5}	$8.0 \pm 2.52^{*}$	4
	10^{-4}	$3.0 \pm 1.0^{*}$	8
Нитрендипин	10^{-5}	60.0 ± 3.69	4
	10^{-4}	$4.0 \pm 1.03^{*}$	6
Нифедипин	10^{-5}	64.0 ± 2.58	4
	10^{-4}	$32.2 \pm 2.01*$	9
Дилтиазем	10^{-5}	69.0 ± 2.32	4
	10^{-4}	58.3 ± 2.91 (ns)	8
Метоксиверапамил	10^{-5}	67.0 ± 2.52	4
	10^{-4}	61.0 ± 3.02	4

Примечание. (ns) – нет достоверных различий по сравнению с контролем (30 мМ К⁺).

— различия достоверны при p < 0.001, *t*-критерий Стьюдента. SE — стандартная ошибка среднего.

КРЕЩЕНКО



Рис. 4. Процент сокращений изолированных мышечных волокон (ось ординат) в ответ на введение серотонина (5-HT) (10^{-5} М, N = 15, число клеток в одной серии везде n = 100) при предварительном, в течение 10 мин, инкубировании клеток с дигидропиридиновыми блокаторами: никардипином 10 мкМ (N=4) и 100 мкМ (N=4); нитрендипином 10 мкМ (N=4) и 100 мкМ (N=4) и нифедипином 10 мкМ (N=9) и 100 мкМ (N=4); а также с метоксиверапамилом 10 мкМ (N=4) и 100 мкМ (N=3) и дилтиаземом 10 мкМ (N=6) и 100 мкМ (N=4). Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). *** – отличие от контроля (5-HT, 10^{-5} М), достоверно при (p < 0.001).



Рис. 5. *а* – Воздействие тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты на сокращение изолированных мышечных волокон планарий, вызванное избытком ионов K^+ (30 мМ). По оси ординат – процент сократившихся мышечных волокон в ответ на введение ионов калия, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты, добавленных в культуру мышечных клеток за 10 мин до начала эксперимента. *1* – Контроль, среднее значение (*N* = 18) процента мышечных сокращений в ответ на введение раствора с высоким содержанием ионов калия, (30 мМ), внизу – эмпирические кривые, описывающие ответы мышечных волокон после их предварительной инкубации с циклопиазоновой кислотой (*2*) и тапсигаргином (*3*), построенные с помощью Fit spline анализа статистической программы GraphPad Prizm 3.02 Software Inc. Число повторных опытов в каждой точке двух нижних кривых – от 3 до 7. Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). *б* – Число сокращений изолированных мышечных клеток планарий, индуцированных 10⁻⁵ М серотонином (*1*) после предварительного культивирования с 10⁻⁵ М тапсигаргином (*3*). Разбросы – стандартная ошибка среднего (SE). *б* – Число сокращений изолирования с 10⁻⁵ М тапсигаргином (*2*) и 10⁻⁵ М циклопиазоновой кислотой (*3*). Разбросы – стандартная ошибка среднего стандартное отклонение.

нии цитоскелета мышечного волокна. Конъюгация фаллоидина с флуорохромом (например, TRITC или FITC) позволила исследовать окрашенные ткани с помощью флуоресцентного или конфокального сканирующего микроскопов [20, 21]. Наличие актина у планарий было продемонстрировано итальянскими исследователями в 1992 году [22]. Однако, несмотря на некоторый прогресс в области изучения мускулатуры у представителей плоских червей, и, в частности, планарий, сведения о ее строении и тем более о ее функционировании, ограничены для большин-

ства известных видов. Так, анатомия мышечной системы была детально изучена только у нескольких видов планарий – Dugesia japonica [23], G. tigrina, P. tenuis [21, 24], S. mediterranea [25]. Морфология мускулатуры у планарий G. tigrina, S. mediterranea и P. tenuis, используемых в настоящей работе, имеет общие черты. Так, мышечная стенка тела у этих животных высоко упорядочена и регулярно организована: под наружными кольцевыми мышечными волокнами располагаются внутренние продольные волокна, вместе они составляют компактно упакованные слои мышц. Немногочисленные и редко расположенные диагональные мышечные волокна локализуются между продольными и кольцевыми слоями миофибрилл. У G. tigrina расположение миофиламентов в стенке тела менее плотное по сравнению с S. mediterranea. Наиболее компактно мышечные волокна упакованы у планарий *P. tenuis*, однако расположение слоев у G. tigrina не отличается от такового у *P. tenuis*. Дорзо-вентральные мышечные волокна более или менее равномерно пронизывают все тело планарии. Настоящая работа показала консервативность общего плана строения мускулатуры тела у изучаемых видов планарий.

С помощью иммуноцитохимического метода и специфических антител в нервной системе планарий *P. littoralis* были выявлены два нейропептида – NPF и GNFFRFамид. Пространственное расположение пептидергических структур позволило описать базовую морфологию центральной нервной системы у данного вида планарий [26, 27]. В доступной литературе сведений о наличии серотонина в нервной системе *P. littoralis* не имеется. Серотонинергические клетки и волокна обнаружены в нервной системе некоторых других близкородственных видов, например, Crenobia alpina, Microstomum lineare, Castrella truncate, S. mediterranea, Dendrocoelum lacteum, Planaria torva (для ссылок см. [19]). У G. tigrina серотониновые нейроны были описаны в глотке [28] и центральной нервной системе [19, 29].

В исследованиях, посвященных выявлению серотонина у планарий, взаимодействие серотонинергических нервных волокон и мышечных филаментов либо вообще не изучалось, либо окраска мускулатуры в ходе идентификации серотонинергических нервных элементов не проводилась. Так, о тесном соседстве мышечных и серотониновых нервных волокон у планарий S. mediterranea есть упоминание в работе Цебрия [30]. В работе [31] авторы наблюдали проникновение тонких серотонин-иммунопозитивных нервных волокон в глубь мускулатуры тела у планарий *B. kewense*. В настоящем исследовании, проведенном с помощью высокоспецифического окрашивания тканей антителами к серотонину и гистохимического окрашивания мышечных филаментов флуоресцентно меченным фаллоидином, было продемонстрировано тесное взаиморасположение серотонинергических нервных элементов (клеток и волокон) и мускулатуры тела у трех видов планарий — *P. tenuis, G. tigrina* и *S. mediterranea*. Полученные данные могут указывать на важную роль нейромедиатора серотонина в регуляции функциональной активности мускулатуры планарий.

Роль серотонина в организме планарий мало изучена. Имеются единичные работы, в которых выяснялось участие серотонина в регуляции мышечной или локомоторной активности. В этих работах показано, что серотонин стимулирует биение ресничек, покрывающих поверхность тела планарий, и способствует их передвижению в воде [32], а также вызывает специфические движения ("сворачивания", "скручивания") при добавлении в воду [33]. В литературе же, касающейся паразитических видов Platyhelminthes, ранее обсуждалась роль серотонина как в индукции двигательной активности целых червей [34], так и в отношении мышечных препаратов или изолированных мышечных волокон [35, 36]. Однако в силу объективных трудностей работы с паразитическими видами, когда требуется большое количество животных для постановки физиологических экспериментов, исследования носили нерегулярный характер, и точные механизмы действия серотонина на мускулатуру не были определены.

Исследования, проводимые на планариях, близких родственников паразитических червей, которые введены в лабораторную культуру и доступны в больших количествах для проведения экспериментов, могут пролить свет на механизмы мышечного сокращения у плоских червей. Методика получения жизнеспособных изолированных мышечных волокон у планарий разработана в Королевском Университете Белфаста (Queen's University of Belfast, Великобритания). Эта процедура позволила исследовать прямое действие тестируемых веществ на отдельную мышечную клетку без влияния окружающих ее тканей и нервных импульсов. Работа Моннипени с соавторами [37] была первой, в которой продемонстрировано индуцирующее влияние серотонина на сокращение отдельной мышечной клетки планарий. Представленные здесь данные - это продолжение начатых исследований по изучению мышечного сокращения и идентификации серотониновых рецепторов у планарий. Полученные результаты подтвердили, что высокая концентрация ионов калия и серотонин вызывают сокрашение мышечных волокон у P. littoralis. Исследования показали, что как серотонин-индуцированное, так и вызванное деполяризацией мышечное сокращение зависит от внеклеточного кальция, поскольку блокируется дигидропиридиновыми блокаторами кальциевых каналов (никардипином, нитрендипином и нифедипином). Тапсигаргин и

циклопиазоновая кислота, специфические ингибиторы Ca²⁺-ATP-азы мембраны эндоплазматического ретикулума, вызывающие пассивный выхол Ca²⁺ из внутриклеточных лепо в цитозоль. значительно уменьшали число мышечных сокращений в ответ на высокую концентрацию ионов калия (деполяризацию), но не влияли на серотонин-индуцированное сокращение. Таким образом, сокращение, вызванное серотонином, не зависело от запасов внутриклеточного кальция. Результаты настояшего исследования свидетельствуют о том, что у планарий присутствуют кальциевые ионные каналы (на момент проведения опытов еше не выявленные), обладающие некоторыми свойствами кальциевых каналов позвоночных животных. Отсутствие ингибирующего действия кальциевых блокаторов дилтиазема и метоксиверапамила на сокращение мышечных клеток планарий может указывать на то, что кальциевые каналы планарий отличаются от кальциевых каналов позвоночных. Возбуждающее влияние серотонина на мускулатуру планарий, зависящее от внеклеточного кальция, но не зависящее от внутриклеточных резервов кальция, указывает на существование специфических серотониновых рецепторов, механизм действия которых требует дальнейшего изучения.

Помимо физиологических исследований, проведенные отдельные фармакологические и молекулярно-биологические исследования также свидетельствуют о наличии серотониновых рецепторов у свободноживущих и паразитических плоских червей [38-43]. Высказаны предположения о том, что циклический АМР является посредником в осуществлении серотонином физиологического действия у планарий [38], однако сами рецепторы на молекулярном уровне в то время еще не были идентифицированы. Позднее у планарий *D. japonica* были выявлены четыре G-белок сопряженных рецептора, получивших название 5HTLpla1-4, нуклеотидные последовательности которых были полностью установлены. Эти последовательности имели существенную гомологию с 5HT1A серотониновым рецептором человека и Drosophila5HTdrol рецептором дрозофилы [39]. Еще один рецептор планарий DjSER-7 продемонстрировал высокое сродство к серотонину при его встраивании в ооциты шпорцевой лягушки [40]. Недавно в геномных базах данных паразитических трематод S. mansoni и свободноживущих планарий S. mediterranea было выявлено большое количество гептаспиральных рецепторов, сопряженных с G-белками, из которых 24 у S. mansoni и 66 у S. mediterranea рассматриваются как возможные аминергические рецепторы [41, 42]. Показано снижение двигательной активности взрослых шистосом (S. mansoni) при уменьшении экспрессии одного из рецепторов серотонина (5HTR7) в результате РНК интерференции [43].

Таким образом, проведенные нами иммуноцитохимические и физиологические исследования, наши предыдущие результаты [37] и имеющиеся литературные сведения [39, 43] позволяют предположить, что серотониновые рецепторы планарий локализуются на мембране мышечных клеток и опосредуют миостимулирующее действие серотонина. Изучение механизмов действия серотонина и типа рецепторов, через который этот биогенный амин осуществляет свое влияние у плоских червей, планарий, продолжается. Исследования, проводимые на этих относительно простых организмах, позволяют получить фундаментальную информацию о природе мышечного возбуждения и сокращения и его регуляторных механизмах у животных, находящихся у истоков эволюционного развития всех Bilateria.

Автор выражает благодарность проф. А.Г. Молу (А.G. Maule) и проф. Д.В. Халтону (D.W. Halton) Королевского Университета г. Белфаста (Queen's University of Belfast, Nothern Ireland, UK) за предоставленную возможность работать в лаборатории, а также А. Моусли (Dr. A. Mousley) за помощь в освоении методики культивирования мышечных клеток планарий и ценные рекомендации. Работа в части физиологии мышечного сокращения была поддержана стипендией Королевского Общества Великобритании (Royal Society Fellowship Programme, Великобритания). Иммуноцитохимические исследования по идентификации серотонина в нервной системе планарий поддержаны грантом РФФИ № 18-04-00349а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Baguna J. 1981. Planarian neoblasts. Nature. 290, 14-15.
- Grohme M.A., Schloissnig S., Rozanski A., Pippel M., Young G.R., Winkler S., Brandl H., Henry I., Dahl A., Powell S., Hiller M., Myers E., Rink J.Ch. 2018. The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature*. 554, 56–61. https://doi.org/10.1038/nature25473
- Nogi T., Zhang D., Chan J.D., Marchant J.S. 2009. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated ca channel Beta subunits: Subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (6), e464.
- 4. Page I. H. 1976. The discovery of serotonin. *Perspect. Biol. Med.* **20** (1), 1–8.
- Хожай Л.И., Пучков В.Ф., Отеллин В.А. 1995. Влияние недостатка серотонина на эмбриональное развитие млекопитающих. *Онтогенез.* 26 (5), 350– 355.
- Vleugels R., Verlinden H., Vanden Broeck J. 2015. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter*. 2, e314. https://doi.org/10.14800/nt.314
- Ivashkin E.G., Khabarova M.Yu., Melnikova V.I., Kharchenko O.A., Voronezhskaya E.E. 2017. Local serotonin-immunoreactive plexus in the female repro-

ductive system of hermaphroditic gastropod mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Zoology*. **14** (2), 134–139.

- 8. Baganz N.L., Blakely R.D. 2013. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* **4** (1), 48–63.
- Plieger T., Melchers M., Vetterlein A., Görtz J., Kuhn S., Ruppel M., Reuter M. 2017. The serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) and coping strategies influence successful emotion regulation in an acute stress situation: Physiological evidence. *Int. J. Psychophysiol.* 114, 31–37.
- Okaty B.W., Commons K.G., Dymecki S.M. 2019. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat. Rev. Neurosci.* https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3
- Gershon M.D. 2004. Review article: Serotonin receptors and transporters roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 (7), 3–14.
- Sung D.J., Noh H.J., Kim J.G., Park S.W., Kim B., Cho H., Bae Y.M. 2013. Serotonin contracts the rat mesenteric artery by inhibiting 4-aminopyridine-sensitive Kv channels via the 5-HT2A receptor and Src tyrosine kinase. *Exp. Mol. Med.* 45, e67. https://doi.org/10.1038/emm.2013.116
- Zavaritskaya O, Lubomirov L.T., Altay S., Schubert R. 2017. Src tyrosine kinases contribute to serotonin-mediated contraction by regulating calcium-dependent pathways in rat skeletal muscle arteries. *Pflugers Arch.* 469 (5–6), 767–777. https://doi.org/10.1007/s00424-017-1949-3
- French A.S., Simcock K.L., Rolke D., Gartside S.E., Blenau W., Wright G.A. 2014. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. *J. Insect. Physiol.* 61, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.12.005
- Hrchkova G., Halton D.W., Maule A.G., Show Ch., Johnston C.F. 1994. 5-Hydroxytryptamine (serotonin)-immunoreactivity in the nervous system of *Mesocestoides corty* tetrathyridia (Cestoda: Cyclophyllidea). *J. Parasitol.* 80 (1), 144–148.
- 16. Теренина Н.Б., Густавссон М.К.С. 2014. Функциональная морфология нервной системы паразитических плоских червей (трематоды, цестоды). М.: КМК Товарищество научных изданий. 296 с.
- Blair K.L., Day T.A., Lewis M.C., Bennett J.L., Pax R.A. 1991. Studies on muscle cells isolated from *Schistosoma mansoni*: a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Parasitol.* **102**, 251–258.
- Totten M., Kreshchenko N., Day T., Marks N., Halton D.W., Maule A.G. 2002. Signal transtduction mechanisms mediating muscle contraction in platyhelminth. In: *Proceedings of the 10th International Congress* of *Parasitology*. Vancouver, Canada. p. 117.
- Крещенко Н.Д. 2016. Иммуноцитохимическая идентификация серотонинергических нейронов у планарий *Girardia tigrina*. Биол. мембраны. 33 (5), 353–362.
- 20. Wulf E., Deboben A., Bautz F.A., Faulstich H., Wieland T. 1979. Fluorescent phallotoxin, a tool for the

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4498-4502.

- Крещенко Н.Д. 2017. Некоторые детали морфологического строения мускулатуры планарий, идентифицированные с помощью флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Биофизика. 62 (2), 347–354.
- Pascolini R., Panara F., Di Rosa I., Fagotti A., Lorvik S. 1992. Characterization and fine structural localization of actin- and fibronectin-like proteins in planaria (*Dugesia lugubris* s.1). *Cell. Tiss. Res.* 267, 499–506.
- Orii H., Ito H., Watanabe K. 2002. Anatomy of the planarian *Dugesia japonica*. I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chain. *Zoological Science*. 19, 1123–1131.
- 24. Bueno D., Baguñà J., Romero R. 1997. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia* (Girardia) *tigrina*. *Histochem*. *Cell. Biol.* **107**, 139–149.
- Cebrià F. 2016. Planarian body-wall muscle: regeneration and function beyond a simple skeletal support. *Front. Cell Develop. Biol.* 4, 8. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00008
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sahlgren C., Halton D.W., Maule A.G. Shaw Ch. 1995a. The nervous system of Tricladida. I. Neuroanatomy of *Procerodes littoralis* (Maricola, Procerodidae): An immunocytochemical study. *Invert. Neurosci.* 1, 11–122.
- Mäntylä K., Reuter M., Halton D.W., Maule A.G., Brennan G.P., Shaw C., Gustafsson M.K.S. 1998b. The nervous system of *Procerodes littoralis* (Maricola, Tricladida). An ultrastructural and immunoelectron microscopical study. *Acta Zoologica*. **79**, 1–8.
- Kreshchenko N.D., Reuter M., Sheiman I.M., Halton D.W, Johnston R.N., Shaw Ch., Gustafsson M.K.S. 1999. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Dugesia tigrina* (Plathelminthes). *Invert. Reprod. Dev.* 35 (2), 109–125.
- Reuter M., Gustafsson M.K., Sheiman I.M., Terenina N., Halton D.W., Maule A.G., Shaw C. 1995b. The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesiidae): An immunocytochemical study. *Invert. Neurosci.* 1, 133–143.
- 30. Cebrià F. 2008. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: An immunocytochemical study. *Neurosci. Res.* **61**, 375–384.
- Fernandes M.C., Alvares E.P., Gama P., Silveira M., 2003. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*. *Tissue Cell.* 35, 479–486.
- Sakharov D.A., Golubev A.I., Malyutina L.V., Kabotyanski E.A., Nezlin L.P. 1988. Serotoninergic control of ciliary locomotion in a turbellarian flatworm. In: *Neurobiology of invertebrates: Transmitters, modulators and receptors*. Budapest: Akadémiai Kiadó. p. 479– 491.
- Farrell M.S., Gilmore K., Raffa R.B., Walker E.A. 2008. Behavioral characterization of serotonergic activation in the flatworm Planaria. *Behav. Pharmacol.* 19 (3), 177–182.
- 34. Hrchkova G., Velebny S., Halton D.W., Maule A.G. 2002. *Mesocestoides corti* (syn.*M. vogae*): Modulation of

larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine. *Parasitol*.**124**, 409–421.

- Graham M.K., McGeown J.G., Fairweather I. 1999. Ionic mechanisms underlying spontaneous muscle contractions in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Amer. J. Physiology.* 277, R374–R383.
- Blair K.L., Bennet J.L., Pax R.A. 1993. Serotonin and acetylcholine: further analysis of praziquantel-induced contraction of magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* **107**, 387–395.
- Monneypenny C.G., Kreshchenko N., Day T.A., Moffett C., Halton D.W., Maule A.G. 2001. Physiological effects of platyhelminth FMRFamide-related peptides and classical transmitters on dispersed muscle fibres of the turbellarian, *Procerodes littoralis. Parasitol.* 115, 281–288.
- Creti P., Capasso A., Grasso M., Parisi E. 1992. Identification of a 5-HT receptor positively coupled to planarian adenilate cyclase. *Cell. Biol. Inter. Rep.* 16 (5), 427–432.
- Saitoh O., Yuruzume E., Nakata H. 1996. Identification of planarian serotonin receptor by ligand binding and PCR studies. *Neuroreport.* 8, 173–178.

- Nishimura K., Unemura K., Tsushima J., Yamamuchi Y., Otomo J., Taniguchi T., Kaneko S., Agata K., Kitamura Y. 2009. Identification of a novel planarian G-protein-coupled receptor that responds to serotonin in *Xenopus laevis* oocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 32(10), 1672–1677.
- Zamanian M., Kimber M.J., McVeigh P., Carlson S.A., Maule A.G., Day T.A. 2011. The repertoire of G protein-coupled receptors in the human parasite *Schistosoma mansoni* and the model organism *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics*. 12, 596. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/596
- Zamanian M., Agbedanu P.N., Wheeler N.J., McVeigh P., Kimber M.J., Day T.A. 2012. Novel RNAi-mediated approach to G protein-coupled receptor deorphanization: Proof of principle and characterization of a planarian 5-HT receptor. *PLoS One*. 7 (7), e40787.
- 43. Patocka N., Sharma N., Rashid M., Ribeiro P. 2014. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: A serotonin–activated G protein-coupled receptor controls parasite movement. *PLOS Pathogens*. **10** (1), e1003878.

Investigation of the Physiological Role of Serotonin in Muscle Function in Planarian

N. D. Kreshchenko*

Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia *e-mail: nkreshch@rambler.ru

In the present study, close spatial relationships between peripheral serotoninergic nerve elements and the musculature of the body in planarian *Polycelis tenuis, Schmidtea mediterranea*, and *Girardia tigrina* have been demonstrated using histo- and immunocytochemical methods and a confocal laser scanning microscopy. Such localization of serotoninergic neurons and their fibers indicates an important role of serotonin in the regulation of the muscle function in planarian. Investigation of the mechanisms of muscle contraction in planarian have shown that depolarization caused by high concentration of K⁺ (15–100 mM) and application of serotonin ($10^{-4}-10^{-9}$ M) induced contractions of isolated muscle fibers in *P. littoralis*. Potassium- and serotonin-induced contractions of muscles were inhibited by dihydropyridine-type calcium channel blockers, such as nicardipine, nitrendipine, and nifedipine, suggesting the dependence of the muscle contraction on the external calcium entry. Tapsigargin and cyclopiazonic acid decreased the number of muscle cells contracting in response to potassium ions but did not influence the serotonin-induced contractions. Thus, the muscle contraction caused by serotonin did not depend on the intracellular calcium. The results provide evidence of the presence of different types of receptors and ion channels mediating the muscle contraction in planarians.

Keywords: planarian, musculature, serotonin, receptors, fluorescent microscopy

УДК 577.1

ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К КАРДИОТОНИЧЕСКИМ СТЕРОИДАМ α1-Na⁺,K⁺-АТР-азы ИЗ ПОЧЕК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ УАБАИНА, ДИГОКСИНА И МАРИНОБУФАГЕНИНА

© 2020 г. А. М. Тверской^{*a*}, В. А. Локтева^{*b*}, С. Н. Орлов^{*a*, *c*, *d*}, О. Д. Лопина^{*a*, *}

^а Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия ^b Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119234 Россия ^c Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия ^d Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия *e-mail: od_lopina@mail.ru Поступила в релакцию 11.04.2019 г.

Поступила в редакцию 11.04.2019 г. После доработки 17.05.2019 г. Принята к публикации 28.05.2019 г.

Известно, что сродство α1-субъединицы Na⁺, K⁺-ATP-азы к кардиотоническим стероидам (KTC) у грызунов примерно в 1000 раз меньше, чем у других млекопитающих. В клетках грызунов экспрессируется α 1-**р**езистентная (α 1**R**) к действию КТС изоформа Na⁺, K⁺-ATP-азы, в то время как в клетках других млекопитающих – α 1-чувствительная (sensitive) (α 1S) изоформа. Ранее установлено, что добавление уабаина в концентрациях, полностью ингибирующих α1-изоформу Na⁺, K⁺-ATP-азы, приводит к смерти эндотелиальных и гладкомышечных клеток человека (α1S-Na⁺, K⁺-ATP-аза), но не крысы (α1R-Na⁺, K⁺-ATP-аза). Ключевую роль в процессе выживания и смерти клеток играют конформационные переходы, которые происходят при связывании КТС с ферментом. В данной работе был проведен анализ продуктов трипсинолиза α1-субъединицы в двух основных конформациях Na⁺, K⁺-АТР-азы (E1 и E2-P) для доказательства существования различий в конформации α 1R- и α 1S-субъединиц Na⁺.K⁺-ATP-азы, которые инлуцируются связыванием трех KTC: двух карденолидов (уабаин, дигоксин) и одного буфадиенолида (маринобуфагенин). Обработка трипсином α1S-Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи в конформации E1 приводит к существенному снижению количества α1S-субъединицы, появлению фрагментов с молекулярной массой 40, 35, 23 и 19 кДа. При преинкубации этого фермента с 1 мМ уабаина и дигоксина также наблюдается снижение количества α1S-субъединицы, увеличение количества полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа и существенное возрастание количества белка с молекулярной массой 35.5 кДа, который не обнаруживается после преинкубации фермента с маринобуфагенином (1 мМ). В отсутствие КТС трипсинолиз α1S-Na⁺, K⁺-ATP-азы в конформации E2-P приводит к уменьшению количества α1-субъединицы, увеличению количества продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35.5 кДа. Преинкубация фермента в этой конформации с любым из исследуемых КТС вызывает появление большого количества дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Преинкубация α1R-Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек крысы с любым из исследованных КТС не изменяет набора продуктов протеолиза и их молекулярной массы в случае пребывания фермента в обеих конформациях (Е1 и Е2-Р). Предполагается, что структура центра связывания КТС и конформационный ответ на их связывание с Na⁺, K⁺-ATP-азой в значительной степени определяются первичной структурой ее α1-субъединицы.

Ключевые слова: Na⁺, K⁺-ATP-аза, конформация E1, конформация E2-P, кардиотонические стероиды, трипсинолиз **DOI:** 10.31857/S0233475520010089

ВВЕДЕНИЕ

Na⁺,K⁺-ATP-аза – ATP-аза Р-типа, осуществляющая обмен трех ионов внутриклеточного натрия на два иона внеклеточного калия против электрохимического градиента. В состав фермента входят как минимум два типа субъединиц: каталитическая α- и регуляторная β-субъединица с молекулярными массами ~100 кДа и ~55–65 кДа соответственно. В ходе катализа фермент пребывает в двух основных конформациях (E1 и E2), которые обладают разным сродством к ионам натрия и калия. Для E1-конформации характерно более высокое сродство к Na⁺, для E2 – к K⁺. Процесс катализа сопряжен с переносом концевой фосфорильной группы ATP на консервативный остаток аспарагиновой кислоты активного центра фермента в конформации E1 (с образованием E1-P) с последующим переходом в конформацию E2-P и дефосфорилированием фермента, индуцированным связыванием фермента с внеклеточным K⁺. Эти процессы сопряжены с переносом катионов через мембрану [1, 2].

Каталитическая α-субъединица Na⁺, K⁺-ATPазы представлена четырьмя изоформами (α1-α4). α1-изоформа экспрессируется во всех типах клеток, экспрессия остальных изоформ тканеспецифична [3]. В почках млекопитающих обнаружена только α1-изоформа. Изоформы α-субъединицы различаются по сродству к АТР, ионам-активаторам и специфическому ингибитору – уабаину, принадлежащему к классу кардиотонических стероидов (КТС) [4]. В клетках грызунов экспрессируется резистентная к KTC α 1-изоформа (α 1**R**) Na⁺, K⁺-ATP-азы, сродство которой к этим ингибиторам снижено в 1000 раз по сравнению с α1-чувствительной (sensitive) изоформой Na⁺, K⁺-ATPазы (α1<u>S</u>), обнаруженной в клетках других млекопитающих. Это различие обусловлено заменой в α1S-Na⁺, K⁺-ATP-азе двух аминокислотных остатков: глутамина и аспарагина в позициях 111 и 122 на остатки аргинина и аспарагиновой кислоты в α1R-Na⁺, K⁺-ATP-азе [5].

Среди КТС, в состав которых входит стероидное ядро и лактоновое кольцо в 17-м положении, выделяют две основных группы: карденолиды, которые содержат 5-ти членный лактон, и буфадиенолиды, содержащие 6-ти членный лактон. Большинство карденолидов в 3-м положении стероидного ядра содержат остатки сахаров, буфадиенолиды часто представляют собой агликоны [4]. Карденолиды в значительных количествах содержатся в растениях, тогда как буфадиенолиды — у земноводных (в основном в слизи тропических жаб). Недавно было обнаружено, что в небольших количествах КТС синтезируются в организмах млекопитающих, включая человека [6, 7].

КТС не только ингибируют Na⁺,K⁺-ATP-азу, но, связавшись с ферментом, индуцируют различные сигнальные пути за счет связывания с Na⁺,K⁺-ATP-азой белков-партнеров. Таким путем (независимо от ингибирования фермента) уабаин вызывает смерть эпителиальных клеток почек собаки (линия C7-MDCK) [8, 9]. Это сопровождается фосфорилированием p38 MAPK [8]. Однако у грызунов уабаин не вызывает смерти клеток в концентрациях, которые полностью подавляют активность Na⁺, K⁺-ATP-азы, при этом активируется другая МАРК - ERK¹/2. Экспрессия в клетках грызунов только α1-чувствительной изоформы Na⁺.K⁺-АТР-азы приводит к смерти клеток под действием уабаина. Эти данные позволили предположить, что особенности в аминокислотной последовательности α1S- и α1R-изоформ Na⁺.K⁺-АТР-азы определяют различия в конформациях фермента и, соответственно, приводят к связыванию с ними различных белков, индуцируя в клетках грызунов и других млекопитающих различные сигнальные каскады, один из которых приводит к смерти клеток, а другой, напротив, к их выживанию [10]. До настоящего времени в литературе не описано различий в конформации α1S- и α1R-изоформ Na⁺, K⁺-ATP-азы при связывании с КТС.

Протеолиз является широко используемым методом анализа общей структуры и конформации белков. В случае Na⁺, K⁺-ATP-азы для этих целей часто используют трипсин, поскольку он расщепляет только α -субъединицу фермента, не затрагивая ее β -субъединицу [11]. Поэтому после обработки фермента трипсином обнаруживаются только пептидные фрагменты α -субъединицы.

Классическая картина трипсинолиза α-субъединицы была описана Питером Йоргенсеном (Peter Jørgensen) [12]. В конформации Е1 трипсин осуществляет быстрый протеолиз пептидной связи перед Lys30 и более медленный перед Arg262. В результате происходит накопление большого протеолитического фрагмента с молекулярной массой около 77 кДа и минорных фрагментов. При трипсинолизе α -субъединицы Na⁺, K⁺-ATP-азы в конформации Е2 трипсин обеспечивает накопление полипептидов с молекулярной массой 58 и 41 кДа. При длительном протеолизе (30–60 мин) обеих конформаций фермента наблюдается накопление фрагментов с молекулярной массой 44, 37, 23 и 15 кДа [13-15]. Эти эксперименты были проведены на препаратах Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек кролика, собаки и свиньи при соотношении трипсин/Na⁺, K⁺-ATP-аза = 1/25 или 1/20.

Цель настоящей работы заключается в доказательстве существования различий в конформации чувствительной и резистентной $\alpha 1$ R- и $\alpha 1$ S-Na⁺,K⁺-ATP-азы, которые индуцируются связыванием трех КТС: двух кардиенолидов (уабаин, дигоксин) и одного буфадиенолида (маринобуфагенин). В качестве метода исследования мы использовали ограниченный протеолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na⁺,K⁺-ATP-азы, поскольку известно, что изменение конформации может сопровождаться экспозицией или маскировкой участков протеолиза, доступных трипсину [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Трипсин бычий и ингибитор трипсина из плодов сои были куплены у фирмы ПанЭко (Россия). Остальные реактивы были поставлены компанией Sigma (США), ThermoScientific (США), Bio-Rad (США).

Выделение фермента. Na⁺, K⁺-ATP-азу из наружного медуллярного слоя почек свиньи и почек крысы получали в соответствии с методами, описанными ранее [16, 17]. Конечный осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 25 мМ имидазола (pH 7.5), 1 мМ EDTA, 0.25 М сахарозы, до концентрации белка 5–10 мг/мл, после чего суспензию разливали в пробирки по 20–50 мкл и хранили в замороженном состоянии при –80°C.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавторов [18]. Для растворения мембранных белков вместо воды добавляли 0.1% раствор дезоксихолата натрия. В качестве стандарта использовали коммерческий раствор бычьего сывороточного альбумина в концентрации 2 мг/мл (ThermoScientific, США).

Определение активности Na^+, K^+-ATP -азы. Активность Na^+, K^+ -ATP-азы в полученных препаратах определяли по методу Ратбуна и Бетлах [19], измеряя накопление неорганического фосфата в среде следующего состава: 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ ATP, 30 мМ имидазола (pH 7.4). Концентрация белка составляла 1– 5 мкг/мл. Реакцию начинали внесением ATP в пробу. Более подробно этот метод описан нами ранее [20].

Трипсинолиз. Трипсинолизу подвергали Na⁺, K⁺-ATP-азу из почек свиньи и почек крысы, которую предварительно переводили в Е1 или Е2-Р конформацию. Для этого фермент разводили в 20 раз в буфере А (Е1-конформация) или буфере Б (Е2-Р- конформация). Состав буфера А: 10 мМ NaCl, 30 мМ имидазола, 1 мМ EDTA (рН 7.4); состав буфера Б: 30 мМ имидазола, 1 мМ EDTA, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ P_i/Трис (pH 7.4). Далее фермент преинкубировали 10 мин при температуре 37°С с 1 мМ уабаина, дигоксина или маринобуфагенина. Трипсинолиз проводили в течение 5 или 10 мин при температуре 37°С. Соотношение трипсин/Na⁺, K⁺-ATP-аза (w/w) составляло 1/10. Протеолиз останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов в 2-х кратном избытке по отношению к трипсину (w/w). Затем проводили анализ триптических фрагментов методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез проводили в 6% концентрирующем и в

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

12% разделяющем ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [21]. Белки на геле окрашивали Кумасси G-250. Образцы готовили на 4-х кратном буфере, содержащем 250 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% сахарозу и бромфеноловый синий, затем прогревали в течение 15 мин при 50°С. Электрофорез проводили при силе тока: 25мА на одно стекло в концентрирующем геле и 50мА на одно стекло в разделяющем геле. Полученные гели сканировали и обрабатывали (денситометрировали фрагменты протеолиза) с помощью программного пакета TotalLab TL120.

Статистические различия. Статистические различия определяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA), различия считали статистически значимыми при p < 0.01.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Препараты Na⁺, K⁺-ATP-азы, использованные в нашей работе, были получены из медуллярного слоя почек свиньи и крысы. Активность препаратов Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи и крысы составляла 1800–2000 и 500–800 мкмоль $\Phi_{\rm H}/({\rm Mr}$ белка в ч) соответственно при 37°С. Эта активность полностью ингибировалась высокими концентрациями уабаина (1 мМ для фермента из почек свиньи и 5 мМ для фермента из почек крысы).

На гелях, полученных после проведения электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, препаратов из почек свиньи и крысы обнаруживается белковая полоса с полвижностью, соответствующей белку молекулярной массой около 100 кДа (рис. 1а, 3а) и размытая полоса, соответствующая белку с молекулярной массой 55-65 кДа. Белок с молекулярной массой 100 кДа, обнаруженный в обоих препаратах, при иммуноблоттинге окрашивался специфическими антителами против α1-субъединицы (не показано). Это позволяет нам идентифицировать эти белки как α- и β-субъединииы Na⁺, K⁺-ATP-азы. В препарате Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи обнаруживаются и другие белки, общее содержание которых, рассчитанное по интенсивности окрашивания Кумасси G-250, не превышало 15%.

В препарате из почек крысы присутствовал также белок с молекулярной массой около 130 кДа. Наши попытки удалить его из препарата путем внесения модификаций в процедуру выделения не привели к успеху. Мы проанализировали бел-ки этой полосы с использованием метода хромато-масс-спектрометрии (LC/MS) и обнаружили пептидные фрагменты трех белков: α-субъединицы Na⁺, K⁺-ATP-азы, аланиламинопептидазы и мембранной аланиламинопептидазы. При обра-

б а М, кДа 2 3 1 5 6 120000 4 95 → 100000 ед. 72.→ Интенсивность, усл. 55 → 80000 60000 36 → 40000 28 → 20000 0 17 40 100 35.5 Молекулярная масса фрагмента трипсинолиза, кЛа

Рис. 1. Результаты трипсинолиза α IS-Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи в конформации E1 в присутствии KTC (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°С. Соотношение Na⁺, K⁺-ATP-аза/трипсин 10/1. *a* – Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов α IS-Na⁺, K⁺-ATP-азы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: *1* – исходный препарат Na⁺, K⁺-ATP-азы (7.7 мкг); *2* – трипсин и ингибитор трипсина; *3* – Na⁺, K⁺-ATP-аза и трипсин; *4* – комплекс Na⁺, K⁺-ATP-аза–уабаин и трипсин; *5* – комплекс Na⁺, K⁺-ATP-аза–маринобуфагенин и трипсин; *6* – Комплекс Na⁺, K⁺-ATP-аза–маринобуфагенин и трипсин. *6* – Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих α 1-субъединице Na⁺, K⁺-ATP-азы и ее пептидных фрагментов с молекулярной массой 40 и 35.5 кДа. Представлены результаты трех экспериментов, показаны стандартные отклонения; * – *p* < 0.01.

ботке фермента трипсином количество белка в этой полосе уменьшалось незначительно (рис. 3), таким образом, его протеолиз не изменял общую картину трипсинолиза α -субъединицы.

В нашей работе соотношение трипсин/Na⁺, K⁺-ATP-аза (w/w) составляло 1/10, а время инкубации с трипсином -5 мин. Это обусловлено тем, что связывание КТС значительно увеличивает скорость трипсинолиза [17].

На рис. 1 представлены данные электрофоретического анализа продуктов трипсинолиза, полученных из α 1S-субъединицы Na⁺,K⁺-ATP-азы почек свиньи в конформации E1 (соотношение трипсин/Na⁺,K⁺-ATP-аза 1/10, 5 мин при 37°С). Видно, что интенсивность окрашивания α 1S-Na⁺,K⁺-ATP-азы (~100 кДа) после протеолиза существенно снижается (дорожки *1* и *3*). При этом образуется пептидный фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа и небольшое количество пептидного фрагмента с молекулярной массой 35.5 кДа. В небольших количествах появляются еще два пептидных фрагмента с молекулярными массами около 23 и 19 кДа, которые отсутствовали в препарате фермента до протеолиза.

Преинкубация фермента из почек свиньи с уабаином и дигоксином в концентрациях, полностью ингибирующих Na⁺,K⁺-ATP-азу (1 мМ), приводит к существенному и практически одинаковому снижению количества α1S-субъединицы Na⁺,K⁺-ATP-азы и увеличению количества полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа. В то же время в результате преинкубации Na⁺, K⁺-АТР-азы с карденолидами уабаином и дигоксином существенно возрастает количество белка с молекулярной массой 35.5 кДа. Этот белок не обнаруживается после преинкубации фермента с буфадиенолидом маринобуфагенином и последующего трипсинолиза (рис. 1a, дорожка 6). Таким образом, в присутствии карденолидов на поверхности белка экспонируется дополнительный участок расщепления полипептидной цепи трипсином, который недоступен для протеолиза, если фермент преинкубирован с маринобуфагенином. Это означает, что конформация α-субъединицы Na⁺, K⁺-ATP-азы после ее связывания с уабаином и дигоксином отличается от конформации, индуцированной связыванием маринобуфагенина.

На рис. 2 представлены результаты, полученные при электрофоретическом разделении продуктов протеолиза α 1-субъединицы Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи в конформации E2-Р (условия трипсинолиза такие же, как на рис. 1). В результате протеолиза в отсутствие КТС наблюдается уменьшение количества α 1-субъединицы, увеличивается количество продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35.5 кДа. Но преинкубация с любым из исследуемых кардиотониче-



Рис. 2. Результаты трипсинолиза α IS-Na⁺,K⁺-ATP-азы из почек свиньи в конформации E2-P в присутствии КTС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°С. Соотношение Na⁺,K⁺-ATP-азы/трипсин 10/1. *а* – Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов α IS-Na⁺,K⁺-ATP-азы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: *1* – трипсин и ингибитор трипсина; *2* – исходный препарат Na⁺,K⁺-ATP-азы (7.7 мкг); *3* – Na⁺,K⁺-ATP-аза и трипсин; *4* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–уабаин и трипсин; *5* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза– дигоксин и трипсин; *6* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–маринобуфагенин и трипсин. *6* – Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих α 1-субъединице Na⁺,K⁺-ATP-азы и ее пептидных фрагментов с молекулярной массой 45 и 40 кДа. Представлены результаты трех экспериментов, показаны стандартные отклонения; * – *p* < 0.01.

ских стероидов приводит к появлению большого количества дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Это показывает, что в конформации E2-P связывание любого из кардиотонических стероидов обеспечивает одинаковое изменение конформации α1-субъединицы фермента.

При протеолизе α1R- Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек крысы в конформации E1 и E2-P мы наблюдали образование фрагментов с молекулярными массами 40 кДа и не обнаружили появления фрагментов с молекулярной массой 35.5 кДа. Преинкубация фермента с любым кардиотоническим стероидом не изменяла набора продуктов протеолиза и их молекулярной массы в случае пребывания фермента в обеих конформациях (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные по протеолизу α1R-Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи отличаются от данных, полученных ранее другими авторами: мы обнаружили, что под действием трипсина α-субъединица расщепляется с получением в основном фрагмента с молекулярной массой 40 кДа и небольших количеств пептидных фраг-

ментов с молекулярной массой 35.5 кД, 23 и 19 кДа (причем в количественном отношении преобладает фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа). Другие авторы сообщают о получении фрагментов с молекулярными массами 44, 37, 23 и 15 кДа. Однако различия в 3-4 кДа в величине молекулярных масс белков, определенных по электрофоретической подвижности, находятся в пределах ошибки самого метода. Поэтому можно полагать, что получены те же самые полипептиды, о которых сообщали другие авторы [13-15]. Доказать, что наши результаты не отличаются от результатов предшественников, можно лишь путем определения N-концевой последовательности этих пептидов, однако это не являлось целью нашего исследования. Более того, эти авторы не идентифицировали указанные фрагменты таким способом.

В результате нашей работы установлено, что при протеолизе Na⁺, K⁺-ATP-азы из почек свиньи в конформации E1 (но не E2-P) образуется статистически значимое количество пептида с молекулярной массой около 35.5 кДа только в том случае, если с ферментом связаны карденолиды уабаин или дигоксин, но не буфадиенолид маринобуфагенин. В присутствии маринобуфагенина

Puc. 3. Результаты трипсинолиза α 1R-Na⁺,K⁺-ATP-азы из почек крысы в конформации E1 (*a*) и в конформации E2-P (*b*) в присутствии KTC. Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na⁺,K⁺-ATP-аза/трипсин 10/1. Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов α 1R-Na⁺,K⁺-ATP-аза методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: *1* – трипсин и ингибитор трипсина; *2* – исходный препарат Na⁺,K⁺-ATP-азы (7.7 мкг); *3* – Na⁺,K⁺-ATP-аза и трипсин; *4* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–уабаин и трипсин; *5* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–дигоксин и трипсин; *6* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–маринобуфагенин и трипсин; *7* – комплекс Na⁺,K⁺-ATP-аза–уабаин и и маринобуфагенином на дорожка *4*–*6* – 1 мМ, на дорожке 7–10 мМ.

этот фрагмент при трипсинолизе вообще не образуется. Это позволяет считать, что маринобуфагенин при связывании с Na⁺, K⁺-ATP-азой (по крайней мере, в Е1-конформации) обеспечивает создание конформации, отличной от таковой, что создается в присутствие уабаина и дигоксина. Это согласуется с другими нашими данными, полученными на клеточной культуре MDCK [22]. Ранее мы показали, что уабаин индуцирует смерть клеток эпителия почек при значительно более низкой концентрации, чем маринобуфагенин. Возможно, это обусловлено тем, что маринобуфагенин, связываясь с Na⁺, K⁺-ATP-азой не способен создавать конформацию необходимую для связывания с белком-партнером, который индуцирует сигнальный каскад, приводящий к гибели клетки.

Также нами установлено отсутствие различий в продуктах протеолиза, полученных после трипсинолиза комплекса Na⁺,K⁺-ATP-азы из почек крысы со всеми тремя исследованными КTC, как в конформации E1, так и в конформации E2-P. Эти данные показывают, что α1S- и α1R-изоформы фермента различаются не только по их чувствительности к КTC, но и по их способности переходить вследствие связывания КTC в конформацию, которая характерна для Na⁺,K⁺-ATP-азы из почек свиньи и, по-видимому, необходима для связывания нужного белка-партнера. Именно по этой причине α1S- и α1R-изоформы Na⁺,K⁺-ATP-азы после их связывания с КTC способны, по-видимому, инициировать различные сигнальные каскады.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00308.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skou J.C., Esmann N. 1992. The Na,K-ATPase. J. Bioenerg. Biomembr. 24, 249–261.
- 2. Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. 2017. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.* **8**, 371.
- Blanco G., Mercer R.W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. Physiol. 275, F633–F650.
- El-Seedi H.R., Khalifa S.A.M., Taher E.A., Farag M.A., Saeed A., Gamal M., Hegazy M.E.F., Youssef D., Musharraf S.G., Alajlani M.M., Xiao J., Efferth T. 2019. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacol. Res.* 141, 123–175.
- Lingrel J.B., Argüello J.M., Huysse J., Kuntzweiler T.A. 1997. Cation and cardiac glycoside binding sites of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 194–206.
- Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. 2009. Endogenous cardiotonic steroids: Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 61, 9–38.
- 7. Schoner W., Scheiner-Bobis G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: Their roles in hyperten-



sion, salt metabolism, and cell growth. *Am. J. Physiol. Physiol.* **293**, C509–C536.

- Akimova O.A., Lopina O.D., Rubtsov A.M., Hamet P., Orlov S.N. 2010. Investigation of mechanism of p38 MAPK activation in renal epithelial cell from distal tubules triggered by cardiotonic steroids. *Biochem.* 75, 971–978.
- Akimova O.A., Pchejetski D., Hamet P., Orlov S.N. 2006. Modest intracellular acidification suppresses death signaling in ouabain-treated cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 451 (4), 569–578.
- Akimova O.A., Tverskoi A.M., Smolyaninova L.V., Mongin A.A., Lopina O.D., La J., Dulin N.O., Orlov S.N. 2015. Critical role of the α1-Na⁺, K⁺-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. *Apoptosis.* 20, 1200–1210.
- Giotta G.J. 1975. Native (Na⁺ + K⁺) dependent adenosine triphosphatase has two trypsin sensitive sites. J. Biol. Chem. 250, 5159-5164.
- 12. Jørgensen P.L., Collins J.H. 1986. Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of alpha-subunit of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase from outer medulla of mammalian kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **860**, 570–576.
- Dergousova E.A., Poluektov Y.M., Klimanova E.A., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Lopina O.D. 2018. Glutathionylation of Na,K-ATPase alpha-subunit alters enzyme conformation and sensitivity to trypsinolysis. *Biochem.* 83, 969–981.
- 14. Jorgensen P.L. 1977. Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. *Biochim. Biophys. Acta.* **466**, 97–108.

- Jørgensen P.L., Andersen J.P. 1988. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na, K-pump and Ca-pump proteins. J. Membr. Biol. 103 (2), 95–120.
- Jørgensen P.L. 1988. Purification of Na⁺, K⁺-ATPase: Enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney. *Methods Enzymol.* 156, 29–43.
- Akayama M., Nakada H., Omori K., Masaki R., Taketani S., Tashiro Y. 1986. The (Na⁺, K⁺)ATPase of rat kidney: Purification, biosynthesis, and processing. *Cell Struct. Funct.* 11, 259–271.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Rathbun W.B., Betlach M.V. 1969. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 28, 436–445.
- Klimanova E.A., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Orlov S.N., Makarov A.A., Lopina O.D. 2015. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation *FEBS Lett.* 589, 2668–2674.
- 21. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
- Akimova O.A., Bagrov A.Y., Lopina O.D., Kamernitsky A.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2005. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent signaling in C7-MDCK cells. *J. Biol. Chem.* 280, 832–839.

Binding of Ouabain, Digoxin, or Marinobufagenin Induces Different Conformational Changes in Kidney α1-Na,K-ATPase Isoforms, Resistant and Sensitive to Cardiotonic Steroids

A. M. Tverskoi¹, V. A. Lokteva², S. N. Orlov^{1, 3, 4}, O. D. Lopina^{1, *}

¹Department of Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia ²Department of Physics, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia

³National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

⁴Siberian Medical State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: od_lopina@mail.ru

The affinity of rodent Na,K-ATPase α 1-subunit to cardiotonic steroids (CTS) is known to be approximately 1000-fold less than the affinity of Na,K-ATPase α 1-subunit from other mammals. The CTS-<u>r</u>esistant iso-form of Na,K-ATPase α 1-subunit (α 1**R**) is expressed in rodent cells, in contrast to the CTS-<u>s</u>ensitive isoform of the α 1-subunit (α 1**R**), which is expressed in cells of other mammals. Earlier we have established that incubation with ouabain in concentrations that completely suppressed the activity of Na,K-ATPase α 1-isoform (α 1S-Na,K-ATPase) led to a death of human endothelial and smooth muscle cells but did not affect the survival of rat cells expressing α 1R-Na,K-ATPase. Conformational transitions that are induced by CTS binding to Na,K-ATPase play a key role in the process of cell survival. To reveal differences in the CTS-induced conformational changes of α 1R- and α 1S-Na,K-ATPase isoforms, we used three different CTS (two cardenelids, ouabain and digoxin, and one bufadienolid, marinobufagenin) and analyzed the trypsinolysis products of α 1S-Na,K-ATPase in E1 conformation by trypsin results in a significant decrease of the amount of α 1S-subunit and in the appearance of protein fragments with molecular masses of about 40, 35, 23, and 19 kDa. Preincubation of Na,K-ATPase in E1 conformation with ouabain or with digoxin (1 mM) leads to a decrease of the amount of

ТВЕРСКОЙ и др.

 α 1S-subunit, increase of the amount of polypeptide fragment with molecular mass of about 40 kDa, and a significant rise of the amount of fragment with molecular mass of about 35.5 kDa, which was not found after the preincubation of the Na,K-ATPase in E1 conformation with marinobufagenin (1 mM). In the absence of CTS the trypsinolysis of α 1S-Na,K-ATPase in E2-P conformation results in a decrease of the amount of α 1S-subunit and an increase of the amount of proteolytic products with molecular mass of about 40 and 35.5 kDa. Preincubation of the Na,K-ATPase in E2-P conformation in the presence of any of the CTS studied induces the appearance of big amount of an additional peptide fragment with molecular mass of about 45 kDa. Preincubation of α 1R-Na,K-ATPase from rat kidney with any of the CTS does not change the composition of proteolytic products and their molecular masses in either E1 or E2-P conformation. The results suggest that the structure of the CTSbinding site and a conformational response of α 1-Na,K-ATPase to binding of CTS is mainly determined by the primary structure of the CTS-resistant and CTS-sensitive α 1-subunits of the Na,K-ATPase.

Keywords: Na,K-ATPase, conformation E1, conformation E2-P, cardiotonic steroids, trypsinolysis

УДК 612.176.4

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В МИОКАРДЕ КРЫСЫ ПРИ ПРОИЗВОЛЬНОЙ БЕГОВОЙ ТРЕНИРОВКЕ В КОЛЕСЕ: РОЛЬ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ

© 2020 г. А. А. Борзых^{*a*, *}, Е. К. Селиванова^{*b*}, А. А. Швецова^{*b*}, И. В. Кузьмин^{*b*}, А. А. Мартьянов^{*b*}, А. М. Нестеренко^{*c*, *d*}, О. С. Тарасова^{*a*, *b*}

^аГосударственный научный центр Российской Федерации— Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия ^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия ^cНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^dИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 119997 Россия

> *e-mail: borzykh.anna@gmail.com Поступила в редакцию 17.04.2019 г. После доработки 08.05.2019 г. Принята к публикации 08.05.2019 г.

Тиреоидные гормоны повышают сократимость сердца, что связано с их влиянием на Ca²⁺-гомеостаз кардиомиоцитов. Дейодиназа 2 типа (D2), обеспечивающая локальный синтез T_3 из T_4 , необходима для адаптации скелетных мышц к аэробной нагрузке, однако в миокарде ее роль не изучена. Целью работы было оценить влияние физической тренировки на уровни экспрессии генов, регулирующих сократительную функцию сердца, и изучить взаимосвязь содержания мРНК этих генов с показателями системной и локальной продукции Т₃. Самцов крыс Вистар содержали в клетках с беговыми колесами в течение 8 недель, затем от них получали образцы сыворотки крови (для определения гормонов методом ИФА) и мышечной ткани (для определения содержания мРНК методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией). Тренировка сопровождалась умеренной гипертрофией камбаловидной мышцы и повышением содержания в ней мРНК цитратсинтазы. Масса желудочков сердца и уровни экспрессии мРНК αМĤС и βМНС, β₁-адренорецепторов, Cav1.2, Serca2, RyR2 и PLB не различались у тренированной и контрольной групп крыс. Содержание свободного T₃ в крови крыс и экспрессия мРНК D2 в миокарде левого желудочка увеличивались в результате тренировки, при этом между этими показателями была выявлена отрицательная корреляция. У тренированных, но не контрольных крыс наблюдались положительные корреляции содержания мРНК Serca2, Cav1.2 и RyR2 с содержанием мРНК D2, но не с уровнем свободного T_3 в крови. Наличие таких корреляций предполагает, что адаптивные изменения миокарда при физической тренировке обусловлены влиянием локально синтезируемого Т₃, а не повышением его системной продукции.

Ключевые слова: кальциевый гомеостаз, кардиомиоциты, дейодиназа 2, тиреоидные гормоны, физическая тренировка

DOI: 10.31857/S0233475520010041

ВВЕДЕНИЕ

Гормоны щитовидной железы — тироксин (T_4) и трийодтиронин (T_3) — играют важную роль в регуляции многих функций организма, в том числе работы сердечно-сосудистой системы. Хорошо известно, что тиреоидные гормоны повышают сократимость миокарда и что этот эффект обусловлен влиянием этих гормонов на сократительный аппарат кардиомиоцитов и механизмы, ответственные за регуляцию цитоплазматической концентрации Ca^{2+} [1]. Тиреоидные гормоны увеличивают экспрессию гена сердечной изоформы миозина α MHC, которая обладает более высокой ATP-азной активностью, и снижают экспрессию гена β MHC. Они повышают экспрессию гена рианодиновых рецепторов (RyR2), которые формируют Ca^{2+} -каналы саркоплазматического ретикулума, и гена Ca^{2+} -зависимой ATP-азы (Serca2),

которая обеспечивает закачку Ca^{2+} в депо и ускорение расслабления кардиомиоцитов [2–4]. Кроме того, T_3 потенцирует инотропные эффекты катехоламинов путем стимуляции экспрессии β_1 -адренорецепторов (β_1 -AR) [2, 5, 6].

Долговременные эффекты тиреоидных гормонов в кардиомиоцитах опосредованы ядерными рецепторами и связаны с изменением транскрипции генов с гормон-чувствительными последовательностями в промоторном регионе [7]. T_3 по сравнению с T_4 более активен, поскольку обладает более высоким сродством к ядерным рецепторам, в том числе к рецептору $TR\alpha_1$, ключевой мишени тиреоидных гормонов в кардиомиоцах [4, 8]. Локальный синтез T_3 из T_4 в кардиомиоцитах обеспечивает дейодиназа 2 типа (D2) [4, 9], в связи с этим этот фермент является важным участником тиреоидной регуляции сердца.

Физическая тренировка в аэробном режиме нагрузки повышает выносливость скелетных мышц и оказывает благоприятное влияние на работу сердца [10-12], что, среди прочих механизмов, может быть связано с влиянием тиреоидных гормонов. С одной стороны, физическая нагрузка изменяет работу гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, продукцию гормонов щитовидной железой и их потребление тканями [13-15]. С другой стороны, локальный синтез Т₃ с участием D2 является необходимым условием адаптивного повышения экспрессии генов в работающих скелетных мышцах [16], однако в сердце такая регуляторная роль D2 пока не изучена. Таким образом, вопрос об источниках Т₃ и его роли в изменении транскриптома кардиомиоцитов при аэробной нагрузке пока остается открытым.

Целью нашей работы было оценить влияние физической тренировки на уровни экспрессии генов, регулирующих сократительную функцию сердца, и изучить взаимосвязь содержания мРНК этих генов с показателями системной и локальной продукции T₃: содержанием T₃ в крови и экспрессией D2 в миокарде, соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводили на самцах крыс Вистар по протоколу, одобренному комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Животных содержали в помещении вивария с контролируемой температурой и световым циклом 12/12 ч (включение освещения – 9⁰⁰, выключение – 21⁰⁰). Воду и корм для грызунов (ООО "Лабораторкорм", Москва) крысы получали *ad libitum*.

Физическая тренировка крыс. Тренировку крыс проводили в режиме произвольного бега с использованием разработанного нами аппаратнопрограммного комплекса [17]. В возрасте 5 недель крыс попарно помещали в клетки стандарта Т3 с беговым колесом для адаптации к экспериментальным условиям. Через неделю крыс рассаживали индивидуально в клетки без бегового колеса (группа "Контроль") или в клетки с постоянным доступом к колесу (группа "Тренировка"). На ободе колеса диаметрально друг относительно друга были установлены два магнита для детекции каждого полуоборота колеса. Для непрерывной регистрации и анализа показателей беговой активности крыс использовали оригинальное программное обеспечение. Длительность тренировочного цикла составила 8 недель.

Анализ содержания гормонов в крови. Для определения содержания тиреоидных гормонов у крыс из надреза кончика хвоста под местной анестезией брали пробы смешанной крови (500 мкл). Из образцов крови получали сыворотку и замораживали ее при -20° С [17, 18]. Определение содержания общего T₄ и свободного T₃ в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ЗАО "НВО Иммунотех" (Россия).

Получение образцов мышечной ткани. Взятие тканей проводили строго в одно и то же время суток (с 9.00 до 9.30 утра). За 20 ч до получения образцов мышечной ткани беговые колеса были удалены из экспериментальных установок для исключения острого (краткосрочного) влияния физической нагрузки на экспрессию генов. Крыс наркотизировали СО₂ и декапитировали гильотиной, затем выделяли и взвешивали желудочки сердца (правый отдельно, левый с перегородкой) и камбаловидную мышцу. Образцы ткани левого желудочка и камбаловидной мышцы замораживали в жидком азоте и хранили при -70° С до проведения исследований экспрессии генов.

Исследование уровня экспрессии генов (количественная ПЦР с обратной транскрипцией). Экстракцию тотальной РНК из образцов мышечной ткани проводили с помощью набора Clean RNA Standard (Евроген, Россия) по протоколу производителя с некоторыми модификациями. Концентрацию нуклеиновых кислот в полученных образцах измеряли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, The Thermo Scientific, CIIIA). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Fermentas, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) проводили обратную транскрипцию с тотальной РНК (200 нг) с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями нуклеотидов длиной 6 п.н. согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при –70°С до проведения количественной ПЦР.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ

Ген	Белок	Последовательность праймеров (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
Gapdh	GAPDH	Прямой: CCATCAAGGACCCCTTCATT Обратный: CACCAGCATCACCCCATTT	157
Actb	β-Актин	Прямой: CAGGGTGTGATGGTGGGTATGG Обратный: AGTTGGTGACAATGCCGTGTTC	115
Ppia	Циклофилин	Прямой: TGGATGGCAAGCATGTGGTCTTTG Обратный: CTTCTTGCTGGTCTTGCCATT CCT	101
Cs	Цитратсинтаза	Прямой: GTACTATGGCATGACGGAGATG Обратный: TCCGTGCTCATGGACTTG	134
Myh6	αΜΗϹ	Прямой: ACAGAGTGCTTCGTGCCTGAT Обратный: CGAATTTCGGAGGGTTCTGC	151
Myh7	βМНС	Прямой: CTACCCAACCCTAAGGATGCCT Обратный: TTGTGTTTCTGCCTAAGGTGC	75
Dio2	D2	Прямой: CTTTGAACGTGTGTGCATCGT Обратный: TCTCCAGCCAACTTCGGACTT	100
Thra	THRα1	Прямой: GCCCTTACTCACCCCTACA Обратный: TAAGCCAAGCCAAGCTGTCCT	133
Adrb1	β_1 -AR	Прямой: CATCATGGGTGTGTGTTCACGCTCTG Обратный: GCGTAGCCCAGCCAGTTGAAGAA	120
Cacna lc	Cav 1.2	Прямой: САТСТССАТСАССТТСТТСС Обратный: АААТАССТGCATCCCAATCAC	181
Atp2a2	Serca2	Прямой: CGAGTTGAACCTTCCCACAA Обратный: AGGAGATGAGGTAGCGGATGAA	268
Ryr2	RyR2	Прямой: GAGAGCCCGGAAGCTCTGAA Обратный: GGCAACTCCATGGCACACAC	132
Pln	PLB	Прямой: AACTAAACAGTCTGCATTGTGACGA Обратный: GCCGAGCGAGTAAGGTATTGGA	178

Таблица 1. Последовательности праймеров и размеры продуктов ПЦР

Примечание: D2 – дейодиназа 2 типа, β₁-AR – β₁-адренорецепторы, RyR2 – рианодиновые рецепторы типа 2, PLB – фосфоламбан, п.н. – пары нуклеотидов.

Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО Евроген (Россия). Последовательности прямых и обратных праймеров для целевых и референсных генов приведены в табл. 1. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Программа амплификации включала начальную денатурацию при 95°С (10 мин), 40 циклов ПЦР (30 с при 95°С, 30 с при 60°С и 60 с при 72°С) и заключительную инкубацию при 72°С (10 мин).

Определение количества мРНК исследуемых генов относительно мРНК референсных генов (среднее геометрическое по трем генам – GAPDH, β -актин и циклофилин) было выполнено методом $\Delta\Delta$ Ct. Содержание мРНК каждого из генов в образце мышечной ткани тренированных крыс выражали в процентах относительно среднего содержания соответствующей мРНК у контрольных крыс.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Для корреляционного анализа данных вычисляли непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при p < 0.05. Данные в тексте, в таблицах и на рисунках приведены в виде медианы и межквартильного размаха, n – объем выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение тренировочного цикла крысы проявляли беговую активность в темное время суток. За 8 недель тренировки суммарный пробег составил 142.7 (93.5; 261.8) км, суммарное время бега – 76.2 (60.3; 119.3) ч, а средняя скорость в интервалах бега – 29.6 (24.5; 34.3) м/мин. Масса тела крыс к концу эксперимента значительно увеличилась, но не различалась между группами. Вместе с тем относительная масса камбаловидной мышцы у тренированных крыс была увеличена по сравнению с контролем (табл. 2). Уровень экспрессии мРНК цитратсинтазы в этой мышце у бегающих

	Контроль (<i>n</i> = 7)	Тренировка (<i>n</i> = 9)				
Масса тела, г						
В начале эксперимента	99.0 (90.0; 111.0)	90.0 (80.0; 125.3)				
В конце эксперимента	351.0 (320.0; 385.0)#	357.5 (339.0; 398.5) [#]				
Относительная масса органов, мг/100 г массы тела						
Камбаловидная мышца	35.8 (34.2; 40.6)	43.0 (40.8; 44.8)*				
Правый желудочек	53.1 (48.5; 53.8)	54.3 (51.5; 57.2)				
Левый желудочек	231.3 (225.1; 242.4)	243.6 (222.8; 253.4)				
Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови						
Общий Т ₄ , нмоль/л	78.3 (77.6; 88.5)	87.1 (81.8; 92.5)				
Свободный Т ₃ , пмоль/л	4.3 (2.9; 5.6)	6.2 (4.5; 7.6)*				

Таблица 2.	Морфометрические показатели и содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови контрольных
и трениров	занных крыс

Примечание: **p* < 0.05 по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни), [#]*p* < 0.05 по сравнению со значением в начале эксперимента (критерий Вилкоксона).

крыс был вдвое выше, чем в контрольной группе: 205.8 (178.5; 243.5)% и 100.0 (75.6; 146.5)%, соответственно (p < 0.05).

Относительная масса желудочков сердца у тренированных и контрольных животных не различалась (табл. 2). Также не выявлено межгрупповых различий в уровне экспрессии сердечных изоформ миозина (αМНС и βМНС) (рис. 1).

Содержание общего T_4 в крови (показатель секреторной активности щитовидной железы) в результате тренировки не изменилось, но содержание свободного T_3 (активная форма гормона) заметно увеличилось в результате тренировки (табл. 2). Уровни экспрессии мРНК $TR\alpha_1$ у двух групп крыс не различались (рис. 1). Однако у тренированных крыс наблюдалось двукратное повышение экспрессии мРНК D2 по сравнению с кон-

тролем (рис. 1). При этом в группе "Тренировка" была выявлена отрицательная корреляция между уровнем T_3 в крови и экспрессией мРНК D2 в миокарде (рис. 2*a*). В группе "Контроль" такой зависимости не наблюдалось, по всей видимости, в связи с низкой вариабельностью у контрольных крыс как уровня T_3 , так и экспрессии D2 (рис. 2*a*).

В нашей работе не было обнаружено статистически значимых изменений содержания мРНК β_1 -AR, Cav 1.2, Serca2, RyR2 и PLB в миокарде тренированных крыс, однако у большинства животных уровни экспрессии Cav 1.2, Serca2 и RyR2 превышали средний уровень в контроле (рис. 1). В связи с этим представлялось интересным исследовать взаимосвязи содержания мРНК этих генов и D2 в миокарде. В группе "Тренировка" были выявлены положительные корреляции содержания мРНК D2 и Serca2 (рис. 26), D2 и



Рис. 1. Относительные уровни экспрессии генов в миокарде левого желудочка у контрольных (n = 7) и тренированных (n = 9) крыс. За 100% принято среднее значение содержания мРНК данного гена в контрольной группе. *p < 0.05 по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни).



Рис. 2. Взаимосвязь показателей тиреоидного статуса и генной экспрессии в группах "Контроль" (белые кружки, n = 7) и "Тренировка" (черные кружки, n = 9). a – Корреляция содержания свободного T_3 в крови и мРНК дейодиназы 2 (D2) в миокарде. δ , θ , e – Корреляция содержания мРНК D2 и мРНК Са²⁺-зависимой АТР-азы (Serca2, δ), мРНК α_1 субъединицы потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа (Cav 1.2, θ) и мРНК рианодиновых рецепторов 2 типа (RyR2, e). r – Коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень статистической значимости.

Cav 1.2 (рис. 2*в*), а также D2 и RyR2 (рис. 2*г*). В контрольной группе ни для одного из перечисленных выше генов не было выявлено статистически значимой корреляции с экспрессией гена D2, что также может объясняться низкой внутригрупповой вариабельностью показателей.

Следует также отметить, что ни в одной из экспериментальных групп не было выявлено корреляции между содержанием мРНК генов-регуляторов кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов и содержанием свободного T_3 в крови. Коэффициенты корреляции с уровнем свободного T_3 для содержания мРНК RyR2, Cav 1.2 и Serca2 составили -0.45 (p = 0.230), -0.48 (p = 0.188) и -0.54 (p == 0.127) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате произвольной беговой тренировки у крыс выявлены изменения тиреоидной регуляции как на системном, так и на локальном уровне: повышение содержания T_3 в крови и уровня экспрессии мРНК D2 в миокарде левого желудочка, соответственно. При этом у тренированных, но не контрольных крыс содержание мРНК трех генов-регуляторов кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов положительно коррелировало с миокардиальным уровнем экспрессии D2, но не с системным уровнем T_3 .

Прежде всего следует отметить, что в результате использованной нами методики тренировки (произвольный бег в колесе) у крыс наблюдалась умеренная гипертрофия локомоторной (камбаловидной) мышцы и повышение в ней экспрессии мРНК цитратсинтазы. В нашей предыдущей работе, где применялась аналогичная методика тренировки крыс, в локомоторной мышце было выявлено выраженное повышение белков ОХРНОЅ, принадлежащих к различным комплексам дыхательной цепи митохондрий [19]. Сходные результаты описаны и другими авторами [20, 21]. В совокупности эти данные говорят об эффективном влиянии произвольной беговой тренировки на окислительный потенциал локомоторных мышц.

В нашей работе после произвольной беговой тренировки у крыс наблюдалось увеличение содержания T_3 в крови. Предыдущие работы говорят, что влияние физической тренировки на состояние гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси зависит от параметров и субъективной переносимости нагрузки. Так, в экспериментах на крысах интенсивная тренировка на беговой дорожке может сопровождаться снижением содержания в крови тиреотропного гормона, T_4 и T_3 [22], тогда как тренировка в бесстрессовых условиях (произвольный бег в колесе) не вызывает таких изменений [14].

Следует отметить, что повышение свободного Т₃ в крови крыс наблюдалось на фоне неизменного уровня Т₄, который отражает общую секреторную активность щитовидной железы. Такое соотношение уровней двух форм тиреоидных гормонов может быть связано с влиянием физической тренировки на экспрессию и активность дейодиназы первого типа (D1). D1 локализована в щитовидной железе, печени и почках и является основным источником циркулирующего в крови Т₃, в отличие от D2, которая синтезирует T₃ преимущественно для собственных нужд клетки [9, 23]. Вторым объяснением может служить изменение содержания или же некоторое превышение буферной емкости белков-переносчиков тиреоидных гормонов в крови тренированных крыс при повышении содержания Т₃. К сожалению, на основании измерения только двух форм тиреоидных гормонов мы не можем сказать, какое из приведенных выше объяснений верное. Отметим, что повышение циркулирующего Т₃ в крови было недостаточным для ингибирования тиреоидной оси по механизму отрицательной обратной связи.

Повышение содержания свободного Т₃ в крови является предпосылкой для его влияния на экспрессию генов в миокарде. Среди многочисленных мишеней Т₃ в кардиомиоцитах наиболее интересными для нас были ген D2, а также генырегуляторы обмена Ca²⁺ в кардиомиоцитах. Известно, что тиреоидные гормоны подавляют экспрессию гена D2 [24]. В связи с этим вполне закономерна выявленная нами в группе тренированных крыс отрицательная корреляция между системным уровнем свободного Т₃ и содержанием мРНК D2 в миокарде. В контрольной группе крыс вариабельность этих показателей сравнительно невелика, тогда как тренировка приводит к возникновению их значительных индивидуальных различий. Однако, несмотря на негативное

влияние T₃, уровень экспрессии D2 в миокарде после тренировки все же увеличен по сравнению с контролем. Очевидно, что межгрупповые различия в экспрессии D2, возникающие в результате тренировки, обусловлены влиянием не циркулирующего в крови T₃, а иными, но также связанными с физической активностью механизмами. Ранее было показано, что уровень экспрессии D2 в бурой жировой ткани повышается при симпатической стимуляции [5, 6], а повышение экспрессии D2 в скелетных мышцах при беговой нагрузке устраняется блокадой β-адренорецепторов [16]. Как известно, физическая нагрузка связана с повышением активности симпатической нервной системы [25], которое может служить стимулом к увеличению экспрессии D2 в миокарде. Следует отметить, что, согласно общепринятой точке зрения, активность D2 преимущественно определяется ее содержанием в клетках [23].

Мы не обнаружили статистически значимых изменений экспрессии мРНК генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в сердце тренированных крыс. Следует отметить, что влияние физической тренировки на экспрессию этих генов в миокарде исследовано мало, и нам удалось найти лишь одну работу по этому вопросу [26]. Авторы этой работы также не обнаружили изменения содержания мРНК β_1 -AR, Cav 1.2, Serca2, RyR2 и PLB в левом желудочке самок крыс при беговой тренировке в колесе в течение 7 недель. Возможно, интенсивность нагрузки при произвольной беговой тренировке недостаточно высока для выраженного потенцирования экспрессии этих генов.

Вместе с тем хорошо известно, что увеличение сократимости сердечной мышцы под действием T_3 связано с повышением экспрессии генов RyR2 и Serca2 [2–4]. Нами выявлены положительные корреляции экспрессии мРНК D2 и генов RyR2, Cav1.2, Serca2 в группе тренированных крыс. Наличие таких корреляций предполагает, что увеличение экспрессии D2 вследствие тренировки приводит к локальному повышению продукции T_3 в кардиомиоцитах и, следовательно, росту экспрессии генов, регулирующих их кальциевый гомеостаз.

В контрольной группе крыс содержание мРНК RyR2, Cav 1.2 и Serca2 не коррелирует с экспрессией D2: индивидуальные различия этих показателей у нетренированных крыс невелики, что, среди прочих причин, может быть обусловлено влиянием отрицательной связи между внутриклеточным уровнем T_3 и экспрессией D2 (сдвиг одного из показателей может компенсироваться за счет противоположного изменения другого). У тренированных крыс повышение активности симпатоадреналовой системы стимулирует экспрессию D2, что приводит к локальному увеличению продукции T3, активации тиреоидного сигналинга и росту экспрессии генов RyR2, Cav 1.2 и Serca2.

Следует отметить, что мы проводили анализ экспрессии генов Serca2 и RyR2 с учетом всех возможных транскрипт-вариантов (трех вариантов для Serca2 и двух – для RyR2). Показано, что различные транскрипт-варианты Serca2 экспрессируются с одного промотора, в котором имеются тироид-чувствительные элементы [27]. В связи с этим именно суммарное повышение экспрессии транскрипт-вариантов должно отражать влияние T₃ на экспрессию гена Serca2, что было принципиальным для решения нашей задачи. Для гена RyR2 показана четкая связь снижения суммарной экспрессии его транскрипт-вариантов с развитием сердечной недостаточности у крыс [28]. Вместе с тем результаты нашей работы не позволяют однозначно судить о влиянии физической тренировки на механизмы кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов, для ответа на этот вопрос нужны дальнейшие исследования.

Таким образом, в данной работе впервые показано, что адаптивное изменение экспрессии генов-регуляторов кальциевого гомеостаза в миокарде при физической тренировке связано с повышением экспрессии D2 и, следовательно, локального синтеза Т₃. Маловероятно, что оно обусловлено действием циркулирующего Т₃: отрицательная корреляция концентрации Т₃ в крови с содержанием мРНК D2 предполагает скорее снижение, а не повышение экспрессии Serca2, Cav 1.2 и RyR2 в кардиомиоцитах, что противоречит многочисленным данным литературы [1-4]. Мы полагаем, что влияние произвольной тренировки на обмен ионов кальция в кардиомиоцитах обусловлено действием не циркулирующего, а локально синтезируемого в кардиомиоцитах Т₃. В связи с этим физическая нагрузка умеренной интенсивности может быть использована для профилактики снижения и коррекции сократимости сердечной мышцы при заболеваниях различной природы, включая гипотиреоидные состояния.

Работа выполнена по плану фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Исследования экспрессии генов проведены при поддержке РФФИ (грант № 19-015-00482).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Klein I., Ojamaa K. 2001. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* **344** (7), 501–509.
- Danzi S., Klein I. 2012. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *Med. Clin. North Am.* 96, 257–268.
- Mullur R., Liu Y.-Y., Brent G.A. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94, 355– 382.

- 4. Yen P. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. 2001. *Physiol. Rev.* **81** (3), 1097–1143.
- Silva J.E., Bianco S.D.C. 2008. Thyroid-adrenergic interactions: Physiological and clinical implications. *Thyroid.* 18, 157–165.
- Silva J.E., Larsen P.R. 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. 305, 712–713.
- Vella K.R., Hollenberg A.N. 2017. The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 458, 127–135.
- Brent G.A. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. J. Clin. Invest. 122, 3035–3043.
- 9. Kelly G.S. 2000. Peripheral metabolism of thyroid hormones: A review. *Altern. Med. Rev.* **5** (4), 306–333.
- Besnier F., Labrunée M., Pathak A., Pavy-Le Traon A., Galès C., Sénard J.M., Guiraud T. 2017. Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 60 (1), 27–35.
- Padilla J., Simmons G.H., Bender S.B., Arce-Esquivel A.A, Whyte J.J., Laughlin M.H. 2011. Vascular effects of exercise: Endothelial adaptations beyond active muscle beds. *Physiology (Bethesda)*. 26 (3), 132– 145.
- Pósa A., Szabó R., Kupai K., Baráth Z., Szalai Z., Csonka A., Veszelka M., Gyöngyösi M., Radák Z., Ménesi R., Pávó I., Berkó A.M., Varga C. 2015. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: Role of matrix metalloproteinase-2. Oxid. Med. Cell. Longev. 2015, 876805.
- Bernet V., Wartofsky L. 2000. Thyroid function and exercise. In: *Sports endocrinology*. Eds. Warren M., Constantini N. New York: Humana Press Inc., p. 97–118.
- Katzeff H.L., Bovbjerg D., Mark D.A. 1988. Exercise regulation of triiodothyronine metabolism. *Am. J. Physiol.* 255 (6 Pt. 1), E824–E828.
- O'Connell M., Robbins D.C., Horton E.S., Sims E.A., Danforth E. Jr. 1979. Changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine and 3,5,3'-triiodothyronine during prolonged moderate exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (2), 242–246.
- Bocco B.M., Louzada R.A., Silvestre D.H., Santos M.C., Anne-Palmer E., Rangel I.F., Abdalla S., Ferreira A.C., Ribeiro M.O., Gereben B., Carvalho D.P., Bianco A.C., Werneck-de-Castro J.P. 2016. Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α expression in skeletal muscle. *J. Physiol.* **594** (18), 5255–5269.
- Борзых А.А., Кузьмин И.В., Нестеренко А.М., Селиванова Е.К., Мартьянов А.А., Николаев Г.М., Мамонов П.А., Шарова А.П., Тарасова О.С. 2017. Динамика показателей произвольного бега крыс в колесах в течение восьми недель тренировки. Авиакосмическая и экологическая медицина. 51 (3), 66–73.
- Sofronova S.I., Gaynullina D.K., Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kostyunina D.S., Sharova A.P., Martyanov A.A., Tarasova O.S. 2017. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial

60

tone regulation in 2-week-old rats. J. Endocrinol. 235 (2), 137–151.

- Gaynullina D.K., Borzykh A.A., Sofronova S.I., Selivanova E.K., Shvetsova A.A., Martyanov A.A., Kuzmin I.V., Tarasova O.S. 2018. Voluntary exercise training restores anticontractile effect of NO in coronary arteries of adult rats with antenatal/early postnatal hypothyroidism. *Nitric Oxide*. 74, 10–18.
- Henriksen E.J., Halseth A.E. 1995. Adaptive responses of GLUT-4 and citrate synthase in fast-twitch muscle of voluntary running rats. *Am. J. Physiol.* 268 (1 Pt 2), R130-R134.
- Chicco A.J., Schneider C.M., Hayward R. 2005. Voluntary exercise protects against acute doxorubicin cardiotoxicity in the isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2), R424– R431.
- 22. Wahrmann J.P., Fulla Y., Rieu M., Kahn A., Dinh-Xuan A.T. 2002. Altered myosin isoform expression in rat skeletal muscles induced by a changed thyroid state. *Acta Physiol. Scand.* **176** (3), 233–243.
- Gereben B., Zavacki A.M., Ribich S., Kim B.W., Huang S.A., Simonides W.S., Zeöld A., Bianco A.C. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* 29 (7), 898–938.

- 24. Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23** (1), 38–89.
- Michelini L.C., O'Leary D.S., Raven P.B., Nóbrega A.C. 2015. Neural control of circulation and exercise: A translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 309 (3), H381–H392.
- Stones R., Natali A., Billeter R., Harrison S., White E. 2008. Voluntary exercise-induced changes in beta2-adrenoceptor signalling in rat ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* **93** (9), 1065–1075.
- 27. Hartong R., Wang N., Kurokawa R., Lazar M.A., Glass C.K., Apriletti J.W., Dillmann W.H. 1994. Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *J. Biol. Chem.* **269** (17), 13021–13029.
- Qiu Z., Zhang W., Fan F., Li H., Wu C., Ye Y., Du Q., Li Z., Hu X., Zhao G., Sun A., Bao Z., Ge J. 2012. Rosuvastatin-attenuated heart failure in aged spontaneously hypertensive rats via PKCα/β2 signal pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 16 (12), 3052–3061.

Changes in the Expression of Genes Regulating Calcium Homeostasis in Rat Myocardium Induced by Voluntary Wheel Training: The Role of Thyroid Hormones

A. A. Borzykh^{1, *}, E. K. Selivanova², A. A. Shvetsova², I. V. Kuzmin², A. A. Martyanov², A. M. Nesterenko^{3, 4}, O. S. Tarasova^{1, 2}

¹Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia ²Faculty of Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia ³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia

⁴Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia *e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Thyroid hormones increase cardiac contractility due to their effect on the cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis. Deiodinase type 2 (D2), which provides local synthesis of T_3 from T_4 , is essential for the adaptation of skeletal muscles to aerobic exercise, but in the myocardium its role has not been explored. The aim of the work was to assess the effect of wheel training on the expression of genes regulating the heart contractility and to study the relationship of their mRNA content in the myocardium with indicators of systemic and local T_3 production. Male Wistar rats were housed in cages with running wheels for 8 weeks, then serum and muscle tissue samples were obtained to determine hormones and mRNA content by ELISA and quantitative PCR, respectively. The training was accompanied by a moderate hypertrophy of the soleus muscle and an increase in its citrate synthase mRNA content. Ventricle mass and the expression levels of α MHC, β MHC, β_1 -adrenore-ceptors, Cav1.2, Serca2, RyR2, and PLB mRNA were not altered as compared with control. Serum content of free T_3 and the content of D2 mRNA in the left ventricle increased as a result of training; a negative correlation was found between these indicators. In trained but not in control rats, the levels of Serca2, Cav1.2, and RyR2 mRNA positively correlated with the D2 mRNA content; however, these parameters did not correlate with the blood free T_3 level. The observed correlations suggest that myocardium adaptation to aerobic exercise is governed by the influence of locally synthesized T_3 rather than by an increase in its systemic production.

Keywords: calcium homeostasis, cardiomyocytes, deiodinase 2, thyroid hormones, wheel training

УДК 577.1

РОЛЬ НDАС КЛАССА IIa В ЭКСПРЕССИИ ЕЗ-ЛИГАЗ ATROGIN-1/MAFbx И MuRF1 ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ МЫШЦ

© 2020 г. С. П. Белова^{а, *}, Е. П. Мочалова^а, Т. Л. Немировская^а

^аГосударственный научный центр Российской Федерации— Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия *e-mail: swetbell@mail.ru

Поступила в редакцию 20.04.2019 г. После доработки 09.07.2019 г. Принята к публикации 10.07.2019 г.

Изучена роль гистондеацетилаз 4/5 (HDAC4/5) в активации миогенина и E3-лигаз (MuRF1 и MAFbx) при функциональной разгрузке m. soleus. С этой целью при вывешивании крыс использовали трихостатин А – ингибитор гистондеацетилаз. Крыс Вистар (24 трехмесячных самца) разделяли на три группы (по восемь в каждой). Одна группа служила контролем (C), вторую (HS) и третью группы вывешивали в течение 3 дней (крысам группы 3 при вывешивании вводили трихостатин в дозе 0.6 мг/кг массы тела в сутки внутрибрюшинно (HST)). Крыс забивали сверхдозой нембутала (75 мг/кг веса), и m. soleus немелленно замораживали в жилком азоте. В группе HST обнаружено существенное снижение содержание белка HDAC4 в ядерной фракции (в отличие от группы HS) и его увеличение в цитоплазматической (относительно контроля (p < 0.05)). Введение трихостатина А предотвратило изменение содержания HDAC5 в ядре (относительно группы С), тогда как в группе HS содержание HDAC5 было существенно снижено (p < 0.05). Таким образом, препарат предотвратил действие функциональной разгрузки на ядерную локализацию HDAC 4/5. Уровень транскрипционного фактора миогенина в группе крыс HST не отличался от значений в контроле, тогда в группе HS значительно его превышал (p < 0.05). Экспрессия мРНК ЕЗ-лигазы atrogin-1/MAFbx у крыс HST была такой же, как в контроле, и существенно возрастала в группе HS (p < 0.05). Экспрессия мРНК ЕЗ-лигазы MuRF1 в обеих вывешенных группах была повышена по сравнению с контролем (вне зависимости от введения препарата). Вывод: HDAC4/5 регулируют экспрессию миогенина и экспрессию E3-лигазы atrogin-1/MAFbx. Ингибирование HDAC4/5 не влияет на регуляцию экспрессии Е3-лигазы MuRF1.

Ключевые слова: разгрузка мышц, *m. soleus*, HDAC4, HDAC5, FOXO3, E3-лигазы **DOI:** 10.31857/S023347552001003X

введение

В работе изучена роль гистондеацетилаз 4/5 (HDAC4/5) в активировании транскрипционного фактора миогенина и экспрессии Е3-лигаз (atrogin-1/MAFbx и MuRF1) на ранних сроках функциональной разгрузки m. soleus у крыс. Экспрессия ключевых ЕЗ-убиквитинлигаз определяет интенсивность работы убиквитин-протеасомного пути и, следовательно, развитие атрофии скелетных мышц [1]. Наиболее часто исследовали участие фосфорилирования/дефосфорилирования транскрипционнного фактора FOXO в регуляции экспрессии генов ЕЗ-убиквитинлигаз при разгрузке мышц. Обычно при этом анализируют сигнальный путь Akt/mTOR/p70S6k, при супрессии которого во время разгрузки фактор FOXO может дефосфорилироваться, проникать в ядро и запускать экспрессию ЕЗ-лигаз [2, 3]. Однако мы нередко сталкивались со случаями, когда экспрессия ЕЗ-лигаз была высокой и не соответствовала при этом активности сигнального пути Akt-FOXO [4, 5], что указывало на возможное участие других механизмов, активирующих работу генов ЕЗ-лигаз в мышце. В последнее время стали появляться работы, в которых исследовали возможность взаимодействия гистондеацетилаз (HDAC) с различными транскрипционными факторами [6-8]. В дополнение к регуляции транскрипции генов посредством ацетилирования гистонов, гистонацетилтрансферазы (НАТ) и HDAC влияют на экспрессию генов путем изменения статуса ацетилирования и функции транскрипционных факторов. Мы проверили возможность участия HDAC4/5 в активации экспрессии ЕЗ-лигаз при функциональной разгрузке *т. soleus*. С этой целью крысам при вывешивании в течение 3 суток вводили трихостатин А (специфический ингибитор гистондеацетилаз класса IIа). Выявление механизмов, инициирующих синтез основных мышечных Е3-лигаз, может существенно расширить представление о фундаментальных механизмах развития атрофических процессов в мышце, и послужить основой для разработки подходов к фармакологической коррекции негативных последствий функциональной разгрузки мышц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крысы линии Вистар (24 самца массой 180-200 г) были случайным образом разделены на три группы по восемь животных в каждой: интактный контроль (С), трехсуточное вывешивание с введением плацебо (HS), и трехсуточное вывешивание (HST) с введением ингибитора гистондеацетилаз класса На трихостатина А (в дозе 0.6 мг/кг массы тела в сутки внутрибрюшинно в течение 3 дней). Животные других групп получали инъекции физраствора. Аналогичную концентрацию препарата использовали ранее [9]. Вывешивание задних конечностей крыс делали по стандартной методике Ильина-Новикова [10] в модификации Могеу-Holton [11]. Пищу и воду животные получали ad libitum. Через 3 дня крыс забивали сверхдозой нембутала (75 мг/кг веса), *m. soleus* извлекали, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°С.

Обработка биоматериала. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (додецилсульфат натрия, SDS) с последующим вестерн-блотингом. Делали срезы каждого образца *m. soleus* толщиной 20 мкм (10-15 мг) на микротоме-криостате фирмы Leica. Цитоплазматическую и ядерную фракцию белков выделяли с помощью набора NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, США). После центрифугирования часть супернатанта отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Брэдфорд (Bio-Rad Laboratories, США). Пробы для нанесения разводили в двухкратном буфере для SDS-электрофореза белков по Лэммли (5.4 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% глицерин, 10% β-меркаптоэтанол, 0.02% бромфеноловый синий). Электрофорез проводили в 10% разделяющем ПААГ (0.2% метилбисакриламид, 0.1% SDS, 375 мМ трис-НСІ (рН 8.8), 0.05% персульфат аммония, 0.1% ТЕМЕД) и в 5% концентрирующем ПААГ (0.2% метилбисакриламид, 0.1% SDS, 125 мМ трис-НСІ (рН 6.8), 0.05% персульфат аммония, 0.1% ТЕМЕД). Электрофорез проводили в трисглициновом буфере (192 мМ трис-глицин (рН 8.6), 0.1% SDS). Образцы каждой группы наносили из расчета 20 мкг общего белка в каждой пробе на дорожку и нормировали по уровню GAPDH в той же пробе. Электрофорез проводили при силе тока

15 мА в мини-системе ("Bio-Rad Laboratories") при комнатной температуре.

Вестерн-блотинг. Электроперенос белков проводили в буфере (25 мМ трис (рН 8.3), 192 мМ глицин, 20% метанола, 0.04% SDS) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°С в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories) в течение 2 ч. Электроперенос белков проводили в буфере с 0.08% SDS при 350 мА в течение 1.5 ч. После электропереноса нитроцеллюлозные мембраны инкубировали в течение 5 мин в 0.3% растворе Ponceau Red в 5% уксусной кислоте, затем отмывали в фосфатно-солевом буфере (Биолот) с 0.1% Tween 20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводили для контроля эффективности переноса и чтобы убедиться, в равном количестве общего белка, внесенного в каждую дорожку. Мембраны блокировали в растворе 5% сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (1 ч при комнатной температуре), затем помещали в раствор первичных антител на ночь при +4°С.

Белковые полосы выявляли с использованием первичных антител к pAkt-437 (1 : 1000), Akt (1:1500), HDAC4 (1:500) фирмы Cell Signaling Technology (США), P-FOXO3-253 (1 : 1000), FOXO3 (1:000), миогенину (1:500) фирмы Santa Cruz (США), ламину В (1:1000), HDAC5 (1:500) фирмы Abcam (США), GapDH (1: 10000) фирмы АВМ. Затем мембрану отмывали от первичных антител в PBST (3 раза по 5 мин на шейкере) и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика (1:30000, Jackson Immuno Research, США) или вторичными антителами против иммуноглобулинов мыши (1:18000, Bio-Rad Laboratories, США). Потом мембрану отмывали от вторичных антител в PBST (3 раза по 5 мин на шейкере). Белки выявляли с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories). Хемилюминесцентный сигнал детектировали с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Белковые полосы анализировали с использованием Image Studio Software (LI-COR).

Исследование экспрессии генов. Для проведения ПЦР в реальном времени и оценки количества мРНК из образцов мышечной ткани крыс экспериментальных групп выделяли РНК. Для выделения суммарной РНК из скелетных мышц использовали методику выделения РНК на микроколонках RNeasy Micro (Qiagen, Германия). Образцы *m. soleus* крысы нарезали на микротоме при толщине срезов 20 мкм. Нарезанную ткань в количестве 4—6 мг помещали в пробирку с 300 мкл лизирующего буфера RLT в который добавляли 10 мкл β-меркаптоэтанола. Гомогенат перемешивался в течение 1 мин на Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия). Затем к гомогенату добавляли 589 мкл

воды, очищенной от РНКазы, и 11 мкл раствора протеиназы К (18.7 мг/мл) (Синтол, Россия). Далее раствор инкубировали в течение 15 мин при 55°С, а затем центрифугировали при комнатной температуре в течение 3 мин при 10000 g. Супернатант переносили в новую пробирку с 450 мкл 96-100% этилового спирта, смесь перемешивали пипетированием. Лизат переносили на колонку в пробирке и центрифугировали в течение 15 с при ≥ 8000g. Колонку промывали 350 мкл буфера RW1 центрифугированием (15 с при ≥ 8000 g). На колонку наносили 80 мкл раствора ДНКазы I и выдерживали в течение 20 мин. Затем колонку последовательно промывали буферами RW1, RPE, 80% этанолом. Для элюции колонку переносили в чистую пробирку и наносили 30 мкл воды и центрифугировали (1 мин при 10000 g). Пробирку с водным раствором РНК немедленно помещали в лед, а затем хранили в криостате (-85° C).

Определение содержания мРНК. Поглощение раствора мРНК определяли при помощи спектрофотометра UV 2450 (SHIMADZU, Япония). Снимались показания в диапазоне от 200 до 320 нм. Пробу перед измерением разводили в 21 раз в TE-буфере (10 мМ трис, 1 мМ EDTA, рН 8.0). Чистоту образцов оценивали по соотношению показателей поглощения при различных длинах волн.

Конструирование праймеров. Праймеры подбирали с помощью программы Primer3 v.0.4.0, находящейся в свободном доступе (http://frodo.wi. mit.edu/primer3/).

Используемые в работе праймеры: 5'-СТАСGATGTTGCAGCCAAGA-3' и 5'-GG-САGTCGAGAAGTCCAGTC-3' для MAFbx; 5'-GCCAATTTGGTGCTTTTTGT-3' и 5'-АААТТСАGTCCTCTCCCCGT-3' для MuRF1; 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACA-GTCAA-3' и 5'-GCTTTCCAGAGGGGC-CATCCACA-3' для GAPDH; 5'-TCATGAAGTG-TGACGTTGA-САТСС-3' и 5'-GTAAAA-CGCAGCTCAGTAA-САGTC-3' для β -актина; 5'-ACTCCCTTACGTC-САТСGTG-3' и 5'-CAGGACAGCCCCACTTAAAA-3' для миогенина.

Все праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия).

Обратная транскрипция. Для проведения обратной транскрипции использовали реагенты фирмы Синтол. Для подготовки кДНК водный раствор, содержащий 1 мкг суммарной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17.4 мкМ олиго-d(T)₁₅, инкубировали в течение 3 мин при 70°С и немедленно переносили на лед. Далее к смеси добавляли 11.5 мкл мастер-микса (1.3 мМ dNTP, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл М-MLV-ревертазы, 4 мкл 5× буфера для M-MLV-ревертазы, Синтол). После этого пробы помещали в амплификатор (iQ5 Multicolor Real-Time

РСR Detection System, Bio-Rad Laboratories) для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25° С, 60 мин при 37° С, 5 мин при 95° С, 30 мин при 4° С. После проведения реакции образцы, со-держащие кДНК, хранили при -25° С.

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР в реальном времени смешивали 2 мкл кДНК, 2 мкл смеси праймеров с концентрацией каждого 10 мкМ и 21 мкл мастер-микса (0.3 мМ dNTP, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера Б (pH 8.8), 0.06 ед./мкл Таq-ДНК-полимеразы, Синтол). Реакцию проводили по протоколу: 95° C – 3 мин; 40 циклов: 95° C – 15 с, 60° C – 15 с, 72° C – 20 с, затем 65° C – 5 с и 15° C – 10 мин.

Анализ и статистическая обработка данных. Белковые полосы анализировали с использованием Image Studio Software (LI-COR). Хемилюминесцентный сигнал полосы контрольной группы на мембране принимали за 100%, а сигнал полос других групп сравнивали с сигналом полос контрольной группы, расположенных на одной и той же мембране.

Данные, полученные с помощью ПЦР в реальном времени, анализировали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (метод Ливака). В качестве референсных использовали гены *GAPDH* и β -актина, экспрессия которых постоянна в *m. soleus* в условиях эксперимента.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ REST 2009 v.2.0.12 и OpenOffice.org Calc, находящихся в свободном доступе. REST 2009 v.2.0.12 позволяет анализировать данные по нескольким референсным генам, что снижает вероятность ошибки. Статистическую значимость отличий между группами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. U-критерий был выбран, поскольку количество повторов в выборках не превышало 10. В тексте и на гистограммах результаты анализа экспрессии генов представлены в виде медианы и интерквартильной широты, результаты анализа относительного содержания белков с помощью вестерн-блотинга представлены в виде среднего и ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы впервые исследовали работу HDAC4/5 на ранних сроках функциональной разгрузки мышц и, в частности, их роль в активации экспрессии E3-лигаз. Известно, что существенная экспрессия E3-лигаз наблюдается уже на первые сутки разгрузки мышц, и к третьим суткам достигает своего пика [12]. Известно, что животные с нокаутом генов atrogin-1/MAFbx и MuRF1 устойчивы к снижению мышечной массы [13] Экспрессия этих E3-лигаз может регулироваться несколькими путями. Ранее мы исследовали работу сигнального каскада PI3K/Akt, который регулирует

НDAC4 в цитоплазматической

ытодтной то 80

80 %

60

40

20

0

С

фракции,

140 кДа

58 кДа

*#

HST

б

HS

140 кДа

HST

37 кДа

HDAC 4

GAPDH

Рис. 1. Изменение относительного содержания HDAC4 в ядре (*a*) и цитоплазме (*б*) при введении трихостатина на фоне 3-суточной функциональной разгрузки m. soleus крысы. С – контроль, HS – вывешивание, HST – вывешивание с введением трихостатина. * – Статистически значимое отличие от контроля, p < 0.01, * – Статистически значимое отличие от вывешивания, p < 0.01.



Рис. 2. Изменение относительного содержания HDAC5 в ядре при введении трихостатина на фоне 3-суточной функциональной разгрузки m. soleus крысы. С – контроль, HS – вывешивание, HST – вывешивание с введением трихостатина. * — Статистически значимое отличие от контроля, p < 0.01.

фосфорилирование транскрипционного фактора FOXO3, контролирующего экспрессию этих Е3лигаз. Неизвестно, может ли сигнальный каскад HDAC4/5 контролировать их экспрессию, например, через активацию транскрипционного фактора миогенина при функциональной разгрузке мышц или через ацетилирование сайтов FOXO3 [14]. Мы исследовали такую возможность.

a

HDAC 4

Ламин В

HS

Обнаружено, что в группе животных с введением трихостатина уровень HDAC4/5 достоверно отличался от уровня у животных, вывешенных без ингибитора HDAC (рис. 1, 2). Это показывает, что действие ингибитора на обе HDAC было специфическим. Известно, что трихостатин А несколько сильнее ингибирует HDAC4, чем HDAC5 [15].

Ранее Yoshihara и соавт. (2016) обнаружили увеличение уровня HDAC4 в цитоплазматической и ядерной фракциях мышцы при 10-днев-

ной иммобилизации конечности крысы [16]. Эти ланные согласуются с результатами. полученными в нашем эксперименте, так как в цитоплазматической фракции обеих вывешенных групп (HS и HST) содержание HDAC4 также было существенно выше, чем в контрольной группе (рис. 1б). В ядерной фракции уровень HDAC4 в группы HS лишь незначительно превышал контрольный, тогда как введение трихостатина А резко снизило содержание HDAC4 в ядре (p < 0.05, рис. 1*a*). Ранее было показано, что сумоилирование HDAC4 может быть связано с его ядерным импортом [17]. Постулируется, что кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа (СаМК), которые индуцируют ядерный экспорт, предотвращают модификацию SUMO-1 HDAC4 [17]. Кроме того, модификация зависит от интактного сигнала ядерной локализации и катализируется белком RanBP2 комплекса ядерных пор (NPC), фактором, недав-

том 37

2020

Nº 1

160

140

120 100 80

60

40

20

0

С

НDAC4 в ядерной фракции,

% от контроля

но идентифицированным как лигаза SUMO E3. Обнаружено, что сумоилирование HDAC4 происходит в NPC и сопряжено с ее ядерным импортом. Отмечается, что SUMO-зависимую модификацию HDAC4 и ее значение in vivo только предстоит исследовать [17]. Введение трихостатина А предотвратило изменение содержания HDAC5 в ядре (относительно контрольной группы С), тогда как у крыс группы HS ее содержание было существенно снижено ((p < 0.05), рис. 2). Du Bois P. и соавт. показали [7], что PKD1 создает в HDAC5 мотивы распознавания фосфо-14-3-3, которые рекрутируют белки 14-3-3, что в конечном итоге приводит к ядерному экспорту HDAC5 и активации экспрессии MuRF1. Возможно, что в нашем случае мог быть задействован механизм транспорта HDAC5, описанный ранее [17]. Итак, мы видим, что ингибирование HDAC4/5 трихостатином А по-разному влияет на содержание HDAC4/5 в ядерной фракции по сравнению с содержанием в *m. soleus* животных, вывешенных без препарата. Возможные механизмы ядерного экспорта и импорта этих HDAC приведены выше, однако триггерные механизмы, регулирующие эти изменения при функциональной разгрузке, до сих пор неизвестны. Регуляция структуры хроматина N-концевым ацетилированием гистонов ключевой механизм контроля генной экспрессии. Ранее было показано, что HDAC, которые служат для возврата хроматина в его конденсированное состояние, играют критическую роль в репрессии транскрипции [18–20]. Детальные механизмы активации HDAC4/5 экспрессии Е3-лигаз предстоит только исследовать, но Moresi и соавт. (2010) обнаружили, что в скелетных мышцах мышей, лишенных HDAC4/5, резко снижена экспрессия MuRF1 и atrogin-1/MAFbx [21]. Интересно, что в нашем эксперименте уровень мРНК E3-лигаз (MuRF1 и atrogin-1/MAFbx) в группе HS был существенно выше, чем в контрольной группе (рис. 3). Однако содержание транскриптов atrogin-1/MAFbx в группе HST, не отличалось существенно от контрольного уровня (рис. 3δ), тогда как содержание MuRF1 в *m. soleus* крыс этой группы было существенно увеличено, как и в группе HS (p < 0.05). Итак, ингибирование HDAC4 и 5 в m. soleus in vivo в группах с вывешиванием привело к отсутствию повышения экспрессии только atrogin-1/MAFbx, но не MuRF1. Ранее показано, что сигнальный путь HDAC4миогенин может участвовать в увеличении экспрессии E3-лигаз MuRF1 и atrogin-1/MAFbx при денервации мышц животных с различными генными модификациями [21-23]. Мы впервые обнаружили, что при трехдневной разгрузке *m. soleus* ингибирование HDAC4/5 играет существенную роль в регуляции экспрессии Е3-лигазы atrogin-1/ MAFbx, но не MuRF1. Однако результаты определения экспрессии ЕЗ-лигаз при денервации животных с генной модификацией и при вывешивании несколько различаются. Показано, что при денервации HDAC4/5 контролируют экспрессию обеих ЕЗ-лигаз, тогда как при вывешивании в большей степени – atrogin-1/MAFbx. Миогенин – мышечно-специфический транскрипционный фактор, вовлеченный в координацию множества функций. Повышение экспрессии миогенина наблюдается и при длительной иммобилизации конечности [16]. Могезі и соавт. обнаружили, что у мышей, лишенных HDAC4/5, экспрессия миогенина не повышается при денервации *m. soleus* [21]. В свою очередь, у мышей с нокаутом гена MuRF1 экспрессия HDAC4 и миогенина снижалась при денервации мышцы [23]. С этими результатами согласуется полученное нами существенное повышение уровня миогенина только в группе животных в вывешиванием без ингибитора (HS, рис. 4). Ранее показали, что миогенин способен прямо взаимодействовать с промоторами генов MuRF1 и atrogin-1/MAFbx и индуцировать экспрессию их генов [21, 22]. Однако в группе животных, которым вводили ингибитор HDAC4/5, уровень миогенина был таким же, как в контрольной группе (p < 0.05), а экспрессия E3-лигазы MuRF1 в ней была высокой. Можно заключить, что ингибирование HDAC4/5 влияет на экспрессию миогенина у крыс при вывешивании, и миогенин, по-видимому, контролирует экспрессию atrogin-1/MAFbx. Можно предположить, что в нашем случае миогенин, вероятно, не играет заметной роли в контроле экспрессии гена MuRF1 (рис. 3a, 4). В работе [23] обращается внимание на то, что экспрессия MuRF1 может регулироваться несколькими сигнальными путями, а не только HDAC4/5-миогенин. Например, PI3K/Akt/mTORC1/FOXO. Сообщается также, что транскрипционный фактор FOXO3 может взаимодействовать как с промотором гена atrogin-1/ MAFbx [24–26], так и с промотором гена MuRF1 [26] и активировать их экспрессию. Опубликована схема, показывающая как с помощью HDAC класса Па возможно осуществлять деацетилирование и активацию FOXO [27]. Для проверки возможного влияния FOXO3а на экспрессию ЕЗ-лигаз мы определили также уровень его фосфорилирования, и обнаружили существенное его снижение только в группе HS относительно контроля (-42%, p < 0.05), но не в группе HST (-14%). Итак, мы видим, что HDAC4/5 контролируют уровень миогенина и P-FOXO3a у крыс, подвергнутых трехдневной разгрузке. В свою очередь, контролировать экспрессию atrogin-1/MAFbx при трехдневной разгрузке могли как миогенин, так и FOXO3a. Идентификация транскрипционных факторов, способствующих увеличению экспрессии MuRF1 в группе HST, требует дальнейшего исследования. Известно, что ингибирование Akt способствует проникновению FOXO в ядро, сти-



Рис. 3. Изменение экспрессии мPHK MuRF1 (*a*) и MAFbx (δ) при введении трихостатина на фоне 3-суточной разгрузки *m. soleus* крысы. В качестве референсных генов использованы *GAPDH* и β-актин. С – контроль, HS – вывешивание, HST – вывешивание с введением трихостатина. * – Статистически значимое отличие от контроля, *p* < 0.05.



Рис. 4. Изменение относительного содержания миогенина при введении трихостатина на фоне 3-суточной функциональной разгрузки *m. soleus* крысы. С – контроль, HS – вывешивание, HST – вывешивание с введением трихостатина. * – Статистически значимое отличие от контроля, p < 0.01; [#] – Статистически значимое отличие от вывешивания, p < 0.01.

муляции экспрессии MuRF1 и развитию атрофии мышц [28]. Фосфорилирование FOXO3a мешает этому процессу [2, 3]. Уровень pAkt у крыс обеих групп с вывешиванием был статистически значимо ниже, чем в контроле (на 69% в группе HS и 65% в HST, p < 0.05), что в нашем случае свидетельствует о регуляции фосфорилирования FOXO3a несигнальным каскадом PI3K/Akt/mTORC1. Известна также возможность прямого фосфорилирования FOXO3 с помощью AMPK [29]. Вероятно, экспрессию двух основных E3-лигаз запускают транскрипционные факторы, активируемые разными сигнальными каскадами.

Таким образом, в работе показано, что ингибирование HDAC4/5 предотвращает увеличение экспрессии миогенина и atrogin-1/MAFbx, а также снижение фосфорилирования FOXO3a, которые происходят при трехдневной функциональной разгрузке мышц. Ингибирование HDAC4/5 не влияет на регуляцию экспрессии Е3-лигазы MuRF1.

Работа выполнена на средства РНФ № 18-15-00062.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Glass D.J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294 (5547), 1704–1708.
- Brocca L., Toniolo L., Reggiani C., Bottinelli R., Sandri M., Pellegrino M.A. 2017. FoxO-dependent atrogenes vary among catabolic conditions and play a key role in muscle atrophy induced by hindlimb suspension. J. Physiol. 595 (4), 1143–1158
- 3. Khalil R. 2018. Ubiquitin-proteasome pathway and muscle atrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1088**, 235–248.
- Belova S.P., Shenkman B.S., Kostrominova T.Y., Nemirovskaya T.L. 2017. Paradoxical effect of IKKβ inhibition on the expression of E3 ubiquitin ligases and

unloading-induced skeletal muscle atrophy. *Physiol. Rep.* **5** (16), e13291

- Lomonosova Y.N., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. 2012. Attenuation of unloading-induced rat soleus atrophy with the heat-shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *FASEB J.* 26 (10), 4295–4301.
- Senf S.M., Sandesara P.B., Reed S.A., Judge A.R. 2011. p300 Acetyltransferase activity differentially regulates the localization and activity of the FOXO homologues in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 300, C1490–1501.
- Du Bois P., Pablo Tortola C., Lodka D., Kny M., Schmidt F., Song K., Schmidt S., Bassel-Duby R., Olson EN., Fielitz J. 2015. Angiotensin II induces skeletal muscle atrophy by activating TFEB-mediated MuRF1 expression. *Circ Res.* 117 (5), 424–436.
- 8. Walsha M.E., Van Remmen H. 2016. Emerging roles for histone deacetylases in age-related muscle atrophy. *Nutrition Healthy Aging.* **4** (1), 17–30
- Dupré-Aucouturier S., Castells J., Freyssenet D., Desplanches D. 2015. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, modulates unloaded-induced skeletal muscle atrophy. J. Appl. Physiol. 119 (4), 342–351.
- Novikov V.E., Ilyin E.A. 1981. Age-related reactions of rat bones to their unloading. *Aviat. Space Environ. Med.* 52 (9), 551–553.
- Morey-Holton E., Globus R. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. J. Appl. Physiol. 92, 1367–1377
- Kachaeva E.V., Shenkman B.S. 2012. Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–15.
- Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K., Pan Z.Q., Valenzuela D.M., DeChiara T.M., Stitt T.N., Yancopoulos G.D., Glass D.J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 294 (5547), 1704–1708.
- Bertaggia E., Coletto L., Sandri M. 2012. Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 302, 587–596.
- Marek L., Hamacher A., Hansen F.K., Kuna K., Gohlke H., Kassack M.U., Kurz T. 2013. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells. J. Med. Chem. 56 (2), 427–436.
- Yoshihara T., Machida S., Kurosaka Y., Kakigi R., Sugiura T., Naito H. 2016. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.* 66 (4), 337–343.
- Kirsh O., Seeler J.S., Pichler A., Gast A., Muller S., Miska E., Mathieu M., Harel-Bellan A, Kouzarides T., Melchior F., Dejean A. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* 21 (11), 2682–2691.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

- Kuo M.H., Allis C.D. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEs*says. 20, 615–626.
- Miska E.A., Karlsson C., Langley E., Nielsen S.J., Pines J., Kouzarides T. 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* 18, 5099–5107.
- McKinsey T.A., Zhang C.L., Lu J., Olson E.N. 2000. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 408, 106–111.
- Moresi V., Williams A.H., Meadows E., Flynn J.M., Potthoff M.J., McAnally J., Shelton J.M., Backs J., Klein W.H., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. 2010. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell.* 143 (1), 35–45.
- 22. Bricceno K.V., Sampognaro P.J., Van Meerbeke J.P., Sumner C.J., Fischbeck K.H., Burnett B.G. 2012. Histone deacetylase inhibition suppresses myogenin-dependent atrogene activation in spinal muscular atrophy mice. *Hum. Mol. Genet.* **21** (20), 4448–4459.
- Furlow J.D., Watson M.L., Waddell D.S., Neff E.S., Baehr L.M., Ross A.P., Bodine S.C. 2013. Altered gene expression patterns in muscle ring finger 1 null mice during denervation- and dexamethasone-induced muscle atrophy. *Physiol. Genomics.* 45 (23), 1168–1185.
- Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117, 399–412.
- Clavel S., Siffroi-Fernandez S., Coldefy A.S., Boulukos K., Pisani D.F., Dérijard B. 2010. Regulation of the intracellular localization of Foxo3a by stress-activated protein kinase signaling pathways in skeletal muscle cells. *Mol. Cell Biol.* **30** (2), 470–480.
- Bodine S.C., Baehr L.M. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307 (6), 469– 484.
- Mihaylova M.M., Vasquez D.S., Ravnskjaer K., Denechaud P.D., Yu R.T., Alvarez J.G., Downes M., Evans R.M., Montminy M., Shaw R.J. 2011. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell.* 145, 607–621.
- Kuo T., Lew M.J., Mayba O., Harris C.A., Speed T.P., Wang J.C. 2012. Genomewide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 11160–11165.
- Greer E.L., Oskoui P.R., Banko M.R., Maniar J.M., Gygi M.P., Gygi S.P., Brunet A. 2007. The energy sensor amp-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 282, 30107–30119.

The Role of the Class IIa HDACs in the Expression of E3 Ligases MuRF1 and MAFbx in Rat Soleus at the Early Stage of Muscle Unloading

S. P. Belova^{1, *}, E. P. Mochalova¹, T. L. Nemirovskaya¹

¹Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia *e-mail: swetbell@mail.ru

Muscle unloading leads to its atrophy. The expression of E3 ligases (MuRF1 and MAFbx) increases under these conditions. We hypothesized that HDAC 4 and 5 may regulate the E3-ligase expression in the early stages of muscle unloading and that myogenin may be involved in this process. To check this hypothesis, we administered trichostatin A (inhibitor of HDAC4/5) to male Wistar rats (180-200 g) upon 3-day suspension of the hindlimb. Twenty four animals were divided into 3 groups (n = 8 in each): C, control; HST, hindlimb suspension with Trichostatin A (i.p., 0.6 mg/kg); HS, hindlimb suspension with placebo administration. The content of the HDAC4 protein in soleus of group HST was decreased in the nuclear fraction as compared to groups HS and C (by $88 \pm 6\%$ and $86 \pm 7\%$, respectively) and increased in the cytoplasmic fraction in both suspended groups HST and HS (by $33 \pm 10\%$ and $21 \pm 9\%$, respectively, vs. group C (p < 0.05). In contrast, the nuclear content of protein HDAC5 in soleus of the HST group did not differ from that of group C, while in group HS this parameter was significantly reduced (by $41 \pm 10\%$, p < 0.05). The myogenin content in the HST group did not differ from that of the C group, while its amount in the HS group was significantly higher (by $30 \pm 6\%$ vs. C, p < 0.05). As for the E3-ligases mRNA expression, MAFbx level in the HST group did not differ from that of control, while in the HS group it increased 2.5-fold (from 1.75- to 3.5-fold, p < 0.05). MuRF1 mRNA expression was equally elevated in both suspended groups, HS and HST, relative to the control ($p \le 0.05$). The results suggest that HDAC 4/5 regulates the expression of myogenin and controls the atrogin-1 expression during a 3-day of unloading. The inhibition of HDAC 4 and 5 does not affect the regulation of the expression of E3 ligase MuRF1.

Keywords: ubiquitin ligases, disuse atrophy, HDAC4, HDAC5, Trichostatin A

УДК 577.3

СНИЖЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЦИСПЛАТИНА ПУТЕМ ЕГО КОНЪЮГАЦИИ С АРАБИНОГАЛАКТАНОМ

© 2020 г. Т. Н. Замай^{а, *}, А. К. Старков^b, О. С. Коловская^{а, c}, А. С. Кичкайло^{а, c}, Е. В. Инжеваткин^c, Г. С. Замай^{а, c}, Н. М. Титова^d, С. С. Замай^c, Ю. С. Пац^a

^aКрасноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия ^bИнститут химии и химических технологий СО РАН, Красноярск, Академгородок, 660036 Россия ^cФедеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр" СО РАН, Красноярск, Академгородок, 660036 Россия ^dСибирский федеральный университет, Красноярск, 660041 Россия *e-mail: tzamay@yandex.ru Поступила в редакцию 12.04.2019 г.

После доработки 11.06.2019 г. Принята к публикации 27.06.2019 г.

Цисплатин – эффективный противоопухолевый препарат, используемый для терапии различных видов рака. Основным недостатком препарата является его высокая токсичность. Для снижения токсического эффекта цисплатина использовали его конъюгацию с арабиногалактаном, способным образовывать растворимые глобулы и связывать плохо растворимые фармакологические препараты путем встраивания их внутрь сфероидальной глобулы. В работе сравнивался биологический эффект и механизм действия цисплатина и его комплекса с арабиногалактаном (АГ-Pt) на рост асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*. Показано, что конъюгаты арабиногалактана с цисплатином обладают хорошим противоопухолевым эффектом, несмотря на то, что доза цисплатина в составе конъюгатов была ниже в 10 раз по сравнению со стандартной дозой. При этом у конъюгатов арабиногалактаном обусловлен инзм противоопухолевых клетках. Предполагается, что снижение токсичности и увеличение эффективности конъюгатов цисплатина с арабиногалактаном ос учистым цисплатина и его конъюгатов с посуденности и увеличение эффективности конъюгатов цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном обусловлен индукцией апоптоза в опухолевых клетках. Предполагается, что снижение токсичности и увеличение эффективности конъюгатов цисплатина с арабиногалактаном по сравнению с чистым цисплатином связано с более эффективным его накоплением в опухолевых клетках.

Ключевые слова: цисплатин, арабиногалактан, апоптоз, асцитная карцинома Эрлиха DOI: 10.31857/S0233475520010090

введение

Цисплатин — комплексное соединение двухвалентной платины, использующееся в онкологии в качестве эффективного противоопухолевого препарата [1, 2] для лечения различных видов рака. Цисплатин особенно эффективен для лечения заболевания на ранней стадии [3]. Однако применение этого препарата ограничено в силу его высокой токсичности, вызывающей нарушения функции почек, анафилактические реакции, лейкопению, тромбоцитопению, анемию и нейропатии, поскольку он не обладает специфичностью в отношении только опухолевых клеток и распределяется во всех биологических жидкостях и тканях организма равномерно [4].

Перспективным способом снижения токсичности и повышения биодоступности цисплатина является его модификация, в результате которой происходит диспергирование цисплатина в матрице арабиногалактана. Арабиногалактан – высокогидрофильный полисахарид, экстрагируемый из лиственницы сибирской, он легко биодеградирует и выводится из организма, имеет низкую полидисперсность и аккумулируется в опухолевых тканях, обладает гепатопротекторными, иммуномодулирующими и мембранотропными свойствами. Кроме того, в силу своих физико-химических свойств он способен образовывать растворимые глобулы и связывать плохо растворимые фармакологические препараты путем встраивания их внутрь сфероидальной глобулы. У цисплатина в составе конъюгатов с арабиногалактаном увеличивается время полураспада и повышается стабильность [5]. Выдвинуто предположение, что в комплексе с арабиногалактаном токсические эффекты цисплатина могут быть



Рис. 1. Динамика развития опухоли в условиях противоопухолевой терапии. 5-е сут (контроль, n = 14; терапия цисплатином, n = 14; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 15), 9-е сут (контроль, n = 12; терапия цисплатином, n = 15; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13), 13-е сут (контроль, n = 14; терапия цисплатином, n = 16; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13), 13-е сут (контроль, n = 14; терапия цисплатином, n = 10; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 10).

снижены при сохранении его противоопухолевых свойств.

В работе сравнивался биологический эффект цисплатина и его комплекса с арабиногалактаном (АГ-Рt) на рост асцитной карциномы Эрлиха *in vivo* и изучался механизм действия этих препаратов на опухолевые клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат, представляющий собой комплекс арабиногалактана с цисплатином, синтезирован по методике [6].

Исследования противоопухолевого эффекта комплекса проведены на мышах-самцах аутбредного стока ICR, полученных из питомника ГНЦ ВБ "ВЕКТОР" (п. Кольцово Новосибирской обл.), массой 27-35 г с внутрибрюшинно трансплантированной асцитной карциномой Эрлиха (3 млн клеток). Противоопухолевую терапию проводили цисплатином и комплексом арабиногалактана с цисплатином (АГ-Pt), доля цисплатина в котором составляла 10% [6]. Введение препаратов проводили на 3, 5, 7, 9 и 11-е сутки развития опухоли. Мышам первой группы (контроль) вводили по 200 мкл физиологического раствора и 200 мкл 5% раствора глюкозы. Мышам второй группы вводили раствор цисплатина в дозе 20 мг/кг и равный объем 5% раствора глюкозы, мышам третьей группы – комплекс арабиногалактана с цисплатином (АГ-Рt) в дозе 20 мг/кг и равный объем 5% раствора глюкозы.

Асцитные клетки выделяли у мышей на 5, 9 и 13-е сутки развития опухоли. Количество изоли-

рованных из брюшной полости асцитных клеток подсчитывали в камере Горяева. Содержание ионов водорода в асцитных клетках определяли с помощью флуоресцеинизотиоцианата (ФИ) [7]. Микровязкость липидного бислоя мембран асцитных клеток оценивали с помощью метода, основанного на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена [8]. Все измерения проводили на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA) при 25°С. Содержание апоптотических и некротических клеток определяли методом флуоресцентной микроскопии [9].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 7.0. Проверку гипотезы о статистической достоверности различий выборок проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p \le 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цисплатин представляет собой эффективный противоопухолевый препарат, недостатком которого является его токсический эффект. В наших исследованиях терапия асцитной карциномы Эрлиха цисплатином в течение 2 недель привела к гибели 3 животных из 15. При лечении комплексом цисплатина с арабиногалактаном (АГ-Pt) такого эффекта не наблюдалось. Масса животных (без опухоли) к концу эксперимента во всех группах была приблизительно одинаковой (контроль – 25.5 ± 2.1 г; в группе животных с введением цисплатина – 28.5 ± 4.0 г; в группе животных с введением комплекса (АГ-Pt) – 25.2 ± 2.3 г).

Исследование противоопухолевого эффекта препаратов показало, что к 13-м сутки развития опухоли число асцитных клеток в карциноме в группе животных, которым вводили цисплатин и комплекс (АГ-Pt), оказалось гораздо ниже, чем в контроле. При этом выяснилось, что комплекс (АГ-Pt) обладал более выраженной способностью подавлять рост асцитной карциномы Эрлиха, чем чистый цисплатин (рис. 1).

Известно, что цисплатин проявляет свой противоопухолевый эффект, индуцируя в опухолевых клетках апоптоз и подавляя пролиферацию [3, 4]. Для определения пути гибели асцитных клеток при терапии комплексом (АГ-Pt) оценивали долю асцитных клеток в состоянии апоптоза и некроза. Исследования качественного состава клеточной популяции в карциноме Эрлиха в условиях подавления ее роста цисплатином и производным арабиногалактана (АГ-Pt) показало, что на 5-е сутки под влиянием цисплатина и комплекса (АГ-Pt) количество апоптотических клеток увеличилось в несколько раз, а на 9-е сутки доля асцитных клеток в состоянии апоптоза увеличилась в еще большей степени (рис. 2). При этом доля клеток в состоянии некроза существенно не изменилась. Таким образом, механизмы действия цисплатина и его комплекса с арабиноглактаном оказались схожими.

Одним из факторов, индуцирующих апоптоз опухолевых клеток под влиянием цисплатина, является окислительный стресс [3, 4]. Для выяснения механизма индукции апоптоза в наших исследованиях под влиянием цисплатина и его конъюгатов определяли физико-химические параметры асцитных клеток. Известно, что активные формы кислорода (АФК), содержание которых в условиях окислительного стресса увеличивается. вызывают перекисное окисление липидов, приводящее к увеличению микровязкости биологических мембран. Следовательно, параметры микровязкости мембран могут служить одним из показателей уровня окислительного стресса. В наших исследованиях вязкость мембран оценивалась по параметрам относительной микровязкости в зоне липидного бислоя. Результаты исследований показали, что микровязкость в зоне липидного бислоя в асцитных клетках контрольной группы животных, начиная с 9-х по 13-е сутки развития опухоли, снижалась (текучесть мембраны увеличивалась) (табл. 1), а в условиях терапии цисплатином и комплексом (АГ-Pt) оставалась на прежнем уровне. Следовательно, можно предположить, что развитие окислительного стресса в опухолевых клетках под влиянием противоопухолевых препаратов не было настолько значительным, чтобы вызвать физико-химические изменения в мембранах. Повышение текучести мембран в асцитных клетках контрольной группы свидетельствовало, скорее всего, о том, что асцитные клетки в этот период находились в состоянии повышенной пролиферативной активности, что подтверждается высокой скоростью роста асцитной карциномы в этот период (рис. 1).

Общим свойством всех трансформированных клеток, кроме генетической вариабельности, является увеличение в них pH, которое всегда сопровождает активный рост опухоли [10] и неопла-



Рис. 2. Доля апоптотических клеток в опухоли в процессе развития опухоли. 5-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 15; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 15, 9-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 13; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13.

стическую трансформацию [11]. Причиной увеличения pH в опухолевых клетках считается активация Na⁺/H⁺-обменника плазматической мембраны, выводящего H⁺ из клетки [12]. Причем индукция Na⁺/H⁺-обмена, реализуемая под влиянием различных факторов, происходит одинаково и всегда ведет к повышению pH [13]. Такое внутриклеточное увеличение pH — ключевое событие в онкогенной трансформации и необходимо для развития и поддержания опухолевого фенотипа [14].

Апоптоз, наоборот, сопровождается повышением в клетке уровня ионов водорода [15]. Поэтому для определения механизма стимуляции процессов апоптоза под влиянием противоопухолевых препаратов цисплатина и его комплекса (АГ-Pt) исследовали содержание ионов водорода в асцитных клетках. Результаты исследований показали, что увеличение в асцитных клетках содержания

Avenaphi valitati uag votati	Продолжительность роста опухоли, сут			
экспериментальная модель	5	9	13	
Контроль	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02	$0.93 \pm 0.08^{*}$	
	(<i>n</i> = 14)	(<i>n</i> = 12)	(<i>n</i> = 14)	
Терапия цисплатином	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.02	
	(<i>n</i> = 14)	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 10)	
Терапия АГ-Рt	0.33 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.02	
	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 13)	(<i>n</i> = 10)	

Таблица 1. Влияние цисплатина и комплекса (АГ-Pt) на относительную микровязкость (J_{9}/J_{M}) , отн. ед.) липидного бислоя в асцитных клетках карциномы Эрлиха в процессе ее развития

* *p* < 0.01.



Рис. 3. Изменение содержания ионов водорода в асцитных клетках в процессе развития опухоли. 5-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 15; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 15), 9-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 13; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13), 13-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 13; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13), 13-е сут (контроль, n = 15; терапия цисплатином, n = 13; терапия комплексом (АГ-Pt), n = 13).

ионов водорода сопровождалось повышением доли клеток в состоянии апоптоза. Так, уровень ионов водорода в асцитных клетках в условиях терапии комплексом (АГ-Pt) в процессе роста опухоли постепенно повышался (рис. 3), что, по-видимому, и стало одной из причин подавления роста асцитной карциномы. В группе мышей, которым вводили цисплатин, уровень ионов водорода относительно контроля на протяжении всего роста опухоли был выше. В асцитных клетках контрольной группы, которым не проводили терапию, уровень ионов водорода на протяжении всего роста опухоли был сниженным, что являлось, по-видимому, одним из факторов стимуляции роста опухоли.

Таким образом, исследования показали, что цисплатин и его комплекс с арабиногалактаном обладают хорошо выраженным противоопухолевым эффектом. Механизм противоопухолевого эффекта этих препаратов заключается в стимуляции в опухолевых клетках процессов апоптоза. Можно предположить, что различия в степени токсичности этих препаратов обусловлены тем, что цисплатин попадает не только в опухоль, но и в здоровые органы и ткани, чем вызывает гибель нормальных клеток. Цисплатин в составе конъюгатов с арабиногалактаном входит более адресно, в клетки с асиалогликопротеиновыми рецепторами, в основном, в опухолевые клетки и гепатоциты.

Основная часть свободного цисплатина при попадании в кровь сразу связывается с белками плазмы крови (альбумином и трансферином), в результате чего этот препарат инактивируется и не попадает в опухолевую ткань. Несвязавшийся с белками плазмы крови цисплатин может поступать в клетки двумя путями: 1) путем простой диффузии и 2) с помощью ATP-зависимого белка-транспортера CTR1 [15] (рис. 4). Очевидно, что для снижения токсичности цисплатина необходимо уменьшить его связывание с белками плазмы и увеличить его накопление в опухолевой ткани, т.е. осуществить его адресную доставку.

Поиск компонентов для создания систем адресной доставки — сложная задача, поскольку все составляющие элементы системы адресной доставки должны быть биоразлагаемыми, неток-



Рис. 4. Механизм транспорта цисплатина и комплекса (АГ-Рt) через клеточную мембрану.
73



Рис. 5. Механизм биологического эффекта цисплатина на уровне клетки.

сичными, ограничивать взаимодействие лекарственного препарата со здоровыми тканями, адресно доставлять его в опухолевые ткани и переносить в опухолевые клетки. В качестве таких компонентов обычно используют искусственные и натуральные полимеры. Арабиногалактан в отличие от других полимеров однороден, имеет низкую молекулярную массу, хорошо растворяется в воде и способен образовывать конъюгаты с лекарственными препаратами, увеличивая их эффективность. Арабиногалактан можно использовать для доставки диагностических и терапевтических средств к тем клеткам, которые имеют на своей поверхности асиалогликопротеиновые рецепторы, лигандом для которых являются углеводы. Связывание углеводов с рецепторами индуцирует эндоцитоз, в результате которого лекарственный препарат оказывается внутри клетки. Эффективность использования арабиногалактана для адресной доставки обусловлена его способностью к рецептор-опосредованному эндоцитозу (рис. 4). Таким образом, эффективность доставки цисплатина в опухолевые клетки в составе его конъюгата с арабиногалактаном становится существенно выше. По-видимому, этим и объясняется более низкий токсический эффект комплекса (АГ-Рt) по сравнению с чистым цисплатином.

В клетке цисплатин связывается с белками цитоскелета, РНК, пептидами и белками. Основной мишенью для проявления цисплатином противо-

опухолевого эффекта является ДНК (рис. 5). Однако только около 1% цисплатина, входящего в клетки, связывается с ДНК [16]. ДНК-аддукты цисплатина ингибируют репликацию и/или транскрипцию и активируют несколько сигнальных путей, вызывающих апоптоз [17]. Под влиянием цисплатина активируются проапоптотические гены PUMA, индуцирующие p53-зависимый путь апоптоза [18]; каспазы [19]; белок, активирующий p53 (PIDD) [20]; семейство МАРкиназ [6]. Активация этих белков вызывает апоптоз клеток. Кроме того, цисплатин нарушает процессы репарации ДНК, ингибируя: 1) белки эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), 2) белки репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR) и 3) ДНК-зависимую протеинкиназу.

Другим механизмом действия цисплатина является вызываемый им окислительный стресс, приводящий к увеличению уровня активных форм кислорода (АФК) и гидроксил-радикалов [21]. Увеличение уровня АФК активирует проапоптотические белки Bak1 и потенциал-зависимый анионный канал (VDAC1) [22]. Цисплатин снижает содержание восстановленного глутатиона GSH, ведет к окислению SH-групп в митохондриальных белках, что обуславливает вход кальция в митохондрии и, как следствие, падение митохондриального мембранного потенциала [23], вызывает высвобождение цитохрома С из митохондрий, активирующего образование комплекса (Apaf-1) и каспаз 9 и 3 [24]. Кроме того, цисплатин повреждает митохондриальную ДНК [25], тем самым способствуя снижению энергообмена клетки в целом. Через фосфорилирование киназ Chk1 и Chk2 цисплатин вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2 [26].

В работе исследован механизм действия нового противоопухолевого препарата на основе цисплатина. Показано, что оба препарата — цисплатин и его комплекс с арабиногалактаном обладают ярко выраженным противоопухолевый эффект комплекса арабиногалактана с цисплатином выше, а токсичность по сравнению со стандартным препаратом цисплатином ниже, в то время как механизм действия обоих препаратов в целом схож. Таким образом, в работе был представлен новый перспективный противоопухолевый препарат на основе стандартного препарата цисплатина, обладающего большей эффективностью и меньшей токсичностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Смышляева Е.А, Колпакова Н.А. 2004. Способность цисплатина поглощаться опухолями и тканями. Современные наукоемкие технологии. **3**, 90–91.
- Go R., Adjeri A. 1999. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatino. J. Clin. Oncol. 17, 409–415.
- Wang D., Lippard S.J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews*. 4, 307– 320.
- Dasari S., Tchounwou P.B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 364–378.
- Pinhassi R.I., Assaraf Y.G., Farber S., Stark M., Ickowicz D., Drori S., Domb A.J., Livney Y.D. 2010. Arabinogalactan-folic acid-drug conjugate for targeted delivery and target-activated release of anticancer drugs to folate receptor-overexpressing cells. *Biomacromolecules*. 11, 294–303.
- 6. Старков А.К., Когай Б.Е. Способ получения Pt-производного арабиногалактана. Патент РФ № 2406508 от 20 декабря 2010.
- Gore M.G. 2000. Spectrophotometry and spectrofluorimetry. Practical Approach. New York: Oxford University Press Inc. 368 p.
- Бордюшков Ю.Н., Горошинская И.А., Франциянц Е.М., Ткачева Г.Н., Горло Е.И., Нескубина И.В. 2000. Структурно-функциональные свойства мембран лимфоцитов и эритроцитов под воздействием переменного магнитного поля. Вопросы мед. химии. 1, 72–80.
- Izumov D.S., Avetisyan A.V., Pletjushkina O.Yu. 2004. "Wages of Fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim. Biophys.Acta.* 1658, 141–147.
- Shrode L.D., Tapper H., Grinstein S. 1997. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (4), 393–399.

- Reshkin S.J., Bellizzi A., Caldeira S., Albarani V., Malanchi I., Poignee M., Alunni-Fabbroni M., Casavola V., Tommasino M. 2000. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* 14, 2185–2197.
- Noel J., Pouyssegur J. 1995. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* 268, 283–296.
- Gillies R.J., Martinez-Zaguilan R., Martinez G.M., Serrano R., Perona R. 1990. Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 7414–7418.
- 14. Harguindey S., Orive G., Pedraz J.L., Paradiso A., Reshkin S.J. 2005. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopatogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin – one single nature. *Biochim. Biophys. Acta.* 1756, 1–24.
- Yang Z.Z., Zou A.P. 2003. Homocysteine enhances TIMP-1 expression and cell proliferation associated with NADH oxidase in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 3, 1012–1020.
- Fuertes M.A., Alonso C., Pérez J.M. 2003. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.* 103, 645–662.
- Yen H.C., Tang Y.C., Chen F.Y., Chen S.W., Majima H.J. 2005. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1042**, 516–522.
- 18. Jeffers J.R., Parganas E., Lee Y. 2003. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptosis pathways. *Cancer Cell.* **4**, 321–328.
- 19. Salvesen G.S., Dixit V.M. 1997. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* **91**, 443–446.
- Lin Y., Ma W., Benchimol S. 2000. Pidd, a new deathdomain containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet.* 26, 122–127.
- Masuda H., Tanaka T., Takahama U. 1994. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1175–1180.
- Sharaf el dein O., Gallerne C., Brenner C., Lemaire C. 2012. Increased expression of VDAC1 sensitizes carcinoma cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agents. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1172–1182.
- Saad S.Y., Najjar T.A., Alashari M. 2004. Role of nonselective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 862–867.
- Petrovic M., Todorovic D. 2014. Apoptosis and cell cycle. *Racionalna terapija*. 6, 21–32.
- 25. Kohno K., Wang K.Y., Takahashi M. 2015. Mitochondrial transcription factor A and mitochondrial genome as molecular targets for cisplatin-based cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 19836–19850.
- Jamieson E.R., Lippard S.J. 1999. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.* 99, 2467–2498.

Reduction of the Cisplatin Toxicity by Its Conjugation with Arabinogalactan

T. N. Zamay^{1, *}, A. K. Starkov², O. S. Kolovskaya^{1, 3}, A. S. Kichkailo^{1, 3}, E. V. Inzhevatkin³, G. S. Zamay^{1, 3}, N. M. Titova⁴, S. S. Zamay³, Yu. S. Patc¹

¹Krasnovarsk Voino-Yasenetsky State University, Krasnovarsk, 660022 Russia

²Institute of Chemistry and Chemical Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

³Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

⁴Siberian Federal Unoversity, Krasnoyarsk, 660041 Russia

*e-mail: tzamay@yandex.ru

Cisplatin is an effective anticancer drug used to treat various types of cancer. The main disadvantage of the drug is its high toxicity. To reduce the toxic effect of cisplatin, we conjugated it with arabinogalactan, which is able to form soluble globules and bind poorly soluble pharmacological compounds by confining them inside spheroidal globules. In this study we compared the biological effect and mechanism of action of cisplatin and its complex with arabinogalactan (AG-Pt) on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in vivo. The results showed that conjugates of arabinogalactan with platinum exerted a strong antitumor effect despite the fact that the dose of cisplatin in the composition of the conjugates was reduced 10-fold. At the same time, the conjugates of arabinogalactan with platinum were virtually nontoxic. The mechanism of action of cisplatin and its conjugates was almost the same and was associated with the induction of apoptosis of tumor cells. Apparently, a decrease in the toxicity and an increase in the effectiveness of the cisplatin conjugates in tumor cells that possess asialoglycoprotein receptors mediating the conjugate entry into the cells.

Keywords: cisplatin, arabinogalactan, mechanocomposites, apoptosis, Erlich ascites carcinoma

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0233475519020087

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Журнал *Биологические мембраны* публикует статьи, обзоры и краткие сообщения, освещающие различные, прежде всего физико-химические и молекулярные аспекты функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы в области клеточной и молекулярной мембранологии и биофизики, а также работы, в которых представлены клеточные и молекулярные аспекты физиологии, фармакологии, иммунологии и медицины. Журнал принимает как экспериментальные, так и теоретические работы в указанных направлениях.

Приветствуются экспериментальные работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты и др.) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз, Ca²⁺-сигнализация и др.).

Предпочтение отдается теоретическим работам, в которых рассматриваются физико-химические свойства мембранных систем в рамках моделей различного уровня детализации, моделируются структура и динамика молекулярных систем, функционирующих в биологических мембранах и в клетке в целом, предлагаются математические модели сигнальных и регуляторных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и клеточных систем.

Английская версия журнала называется "Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology" и распространяется издательством Springer (http://www.springer.com).

Типы публикаций. Основным типом публикаций является исследовательская статья, в которой представлены результаты оригинальных экспериментальных и теоретических работ. Рукопись должна преимущественно содержать новые, ранее не опубликованные данные. Допускается использование собственных, уже представленных материалов, если таковые были опубликованы в виде краткого сообщения или тезисов доклада. Ссылка на предварительное сообщение обязательна.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в кратком виде в разделе *Краткие сообщения*. Целесообразность такой внеочередной публикации должна быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

Журнал публикует *обзоры* и *мини-обзоры*, отражающие существующие представления и важнейшие достижения в области мембранологии, биофизики и биологии клетки, молекулярной и клеточной физиологии, иммунологии и медицины.

Не допускается направление в *Биологические мембраны* статей, которые уже были представлены в другой журнал, книгу или для электронной публикации, а также направление в другой журнал статей, представленных в *Биологические мембраны*.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Формат статей. Рукопись должна быть написана либо на русском, либо на английском языке. Текст печатается шрифтом Times New Roman (12 pt), через 1.5 интервала, с полями 3 см слева и 2.5 см сверху, справа и снизу. Объем исследовательской статьи (включая аннотацию, основной текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) не должен превышать 8000 слов и 8 рисунков, обзора – 12000 слов и 8 рисунков, мини-обзора – 4000 слов и 3 рисунков, краткого сообщения – 2000 слов и 1 рисунка. Правила оформления рукописи размещены на сайте http://www.pleiades.online.

Рукопись надлежит представлять в электронном виде. Следует присылать единый прикрепленный файл, не превышающий 15 Мб, в формате MS Word (*.doc), содержащий текст, таблицы и рисунки (обычно черно-белые) в последовательности, изложенной ниже. Если объем рисунка превышает 1 Мб, он должен быть прислан в виде отдельного файла. При необходимости файлы рекомендуется сжимать в стандарте *WinZip* или *WinRAR*. Цветные иллюстрации принимаются лишь по согласованию с редакцией, и их публикация оплачивается авторами.

Рукопись должна сопровождаться кратким письмом к Главному редактору от автора для корреспонденции, в котором констатируется, что данная работа (название, авторы) направляется для опубликования в журнале *Биологические мембраны* и что все авторы согласны с направлением статьи в журнал.

Сопроводительные документы. Рукопись статьи должна сопровождаться: (а) письмом-направлением и актом экспертизы от учреждения, в котором выполнена работа; (б) заполненными бланками договоров о передаче авторского права на использование

материалов для русской и английской версий журнала. В случае отклонения статьи договор в силу не вступает.

Сопроводительные документы принимаются в электронном виде. Письмо-направление от учреждения с подписью руководителя и печатью, заполненные и подписанные бланки договоров и титульная страница статьи (см. ниже) с подписями всех авторов сканируются и посылаются (biomembranes2010@gmail.com) в формате јред или pdf.

При наличии в авторском коллективе зарубежных соавторов их согласие индивидуально подтверждается письмом, посылаемым в редакцию по электронной почте (biomembranes2010@gmail.com) на имя Главного редактора.

Порядок представления материалов. При оформлении статьи необходимо придерживаться следующего порядка.

Титульная страница:

• индекс УДК (в левом верхнем углу);

 заглавие статьи (не более 150 знаков без пробелов);

• инициалы и фамилии авторов;

• полное название учреждения(ий), почтовый адрес(а);

• инициалы и фамилия автора для корреспонденции с указанием почтового адреса, контактного телефона, факса, электронного адреса;

ключевые слова (3-6);

- количество слов в основном тексте;
- количество таблиц;
- количество рисунков;
- подписи всех авторов.

Основной текст:

• индекс УДК (в левом верхнем углу);

• заглавие статьи (не более 150 знаков, не считая интервалы);

• инициалы и фамилии авторов;

• полное название учреждения(ий), почтовый адрес(а);

- аннотация (до 300 слов)
- ключевые слова (3-6);
- введение
- материалы и методы;
- результаты;
- обсуждение (или результаты и обсуждение)
- благодарности (отдельный абзац без заголовка)
- таблицы (каждая на отдельной странице);
- подписи к рисункам (на отдельной странице);

• список цитированной литературы (на отдельной странице);

 резюме на английском языке или на русском, если основной текст представлен на английском (до 300 слов, на отдельной странице);

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 37 № 1 2020

• рисунки (пронумерованные, каждый на отдельной странице).

Расположение основных материалов теоретической работы произвольно, хотя следует в целом придерживаться последовательности, изложенной выше. Уравнения должны быть напечатаны предпочтительно с помощью Microsoft Equation Editor. Не рекомендуется использование символов корней, вместо них должны использоваться дробные показатели степени. Двоеточие не должно использоваться как знак деления. Уравнения должны нумероваться с правой стороны в скобках. Символы должны быть определены при первом упоминании в тексте. Если количество символов более 10, они должны быть представлены и определены на отдельной странице.

Математические модели должны быть представлены таким образом, чтобы для широкого круга читателей было понятно, какая система (молекулярная, клеточная и др.) или процесс моделируется, каковы исходные постулаты модели и целесообразность ее использования для описания процесса или системы, а также ограничения модели. Методы решения уравнений модели должны быть описаны в деталях, достаточных для их воспроизведения. Коммерческие программы и используемые в них алгоритмы должны быть упомянуты. Основополагающие детали вывода уравнений и/или их решения могут быть представлены в Приложении, помещаемом в конце работы.

Аннотация (не более 300 слов) обязательна для статьи (обзора) и должна давать ясное представление о сути работы, объектах и методах исследования, основных результатах и сделанных выводах.

Раздел *Материалы и методы* должен содержать информацию о методах исследования, достаточную для их ясного понимания и воспроизведения. Методы, описанные ранее, могут быть представлены в краткой форме и должны сопровождаться адекватными ссылками. Необходимо указывать квалификацию и источник основных реактивов; название (в оригинальной транскрипциии) фирмы-изготовителя реактивов/оборудования и страна приводятся в скобках (Serva, Германия). Использованные статистические методы обработки данных, графические программы и т.п. также должны быть указаны.

Таблицы (и рисунки) нумеруются в порядке упоминания их в тексте. Каждая таблица должна иметь заголовок и, если необходимо, краткие пояснения к представленным данным (условия эксперимента, число экспериментов и т.п.).

Рисунки должны быть выполнены с разрешением не менее 300 dpi и в масштабе, допускающем их двукратное уменьшение без потери качества. В сложных рисунках со множественными панелями каждую следует пометить курсивной буквой (a, δ, ε ...). На графиках следует использовать стандартные символы ($\blacktriangle \lor \odot \odot \diamondsuit \square$). В нижней части рисунка необходимо указать его порядковый номер и фамилию первого автора.

Электронные версии штриховых рисунков и полутоновых фотографий должны представляться в формате JPEG или TIFF.

Цитирование литературы. Ссылка на цитированную работу дается в тексте цифрой в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Если ссылка на работу есть в таблице или в подписи к рисунку, ей присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Авторы несут полную ответственность за правильность цитирования работ. Последние должны быть либо опубликованными, либо принятыми в печать. Ссылки на тезисы докладов, диссертации, авторские свидетельства следует приводить только, если они являются единственным источником. Цитирования типа "неопубликованные данные" или "персональное сообщение" не должны включаться в список литературы, но допускаются в тексте (например, Прутков К.Ф., персональное сообщение). При этом предполагается, что авторы получили разрешение на цитирование в какой-либо форме.

Список цитированной литературы должен оформляться следующим образом:

Статья в журнале

Карпушев А.В., Павлов Т.С., Старущенко А.В. 2009. Регуляция эпителиальных натриевых каналов (ENaC) малыми G-белками и фосфатидилинозитидами. *Биол. мембраны.* **26** (4), 265–279.

Takeuchi H., Imanaka Y., Hirono H., Kurahashi T. 2003. Cross-adaptation between olfactory responses induced by two-subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**, 255–264.

Книга

Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с.

Hille B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.

Статья в книге

Леднев В.В. 1977. Исследование структуры актинсодержащих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: *Молекулярная и клеточная* биофизика. Ред. Франк Г.М. М.: Наука, с. 164–172.

Keating M.T 1995. Molecular genetics of the long QT syndrome. In: *Ion Channels and genetic diseases*. Eds Dawson D.C., Frizzell R.A. New York: The Rockefeller University Press, p. 53–60.

Статья, принятая в печать

Додонова С.О., Крупенина Н.А., Булычев А.А. 2010. Подавление Н⁺-проводимости плазмалеммы на фоне высокой активности Н⁺-насоса в клетках *Chara* под действием дитиотреитола. *Биол. мембраны* (в печати).

Во многих международных журналах статьи, принятые в печать, публикуются в электронном виде до выхода бумажной версии. При этом статьи идентифицируются с использованием DOI (digital object identifier), и их следует цитировать в оригинальном формате:

Komaki S., Abe T, Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T. 2010. Nuclear-localized subtype of endbinding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis. J. Cell Sci.* doi: 10.1242/jcs.062703.

Если работы, которые цитировались как *в печати*, были опубликованы на момент получения корректуры, авторы должны внести необходимые исправления в список литературы.

Сокращения и аббревиатуры. Стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (*Eur. J. Biochem.* 1977, 74(1), 1–6), могут быть использованы непосредственно. Нестандартные сокращения химических соединений, сокращения общего характера разрешается вводить лишь в случае многократного употребления. Их следует ввести (в скобках) при первом же использовании сложного словосочетания в основном тексте статьи, например: активные формы кислорода (АФК).

Аббревиатуры или формулы химических соединений, употребляемые как прилагательные, пишутся через дефис: ИК-спектроскопия, ЖК-состояние, Na⁺-форма, OH-группа, но группа OH.

Размерности отделяются от цифры пробелом (100 кПА, 77 К), кроме градусов, процентов и промилле: 90°, 20°С (для градусов Цельсия 20°С, а не 20°), 45%, 10‰. Дробные размерности: 58 Дж/моль, 10 моль/л. Для более сложных размерностей допускается использование степеней, в том числе отрицательных; символы различных размерностей должны быть отделены пробелом: 9.8 м/с² или 9.8 м с⁻², 37 Дж моль⁻¹ град⁻¹. Единообразие написания размерностей в рукописи является обязательным.

При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (10–30 Дж/моль, 22–25°С), за исключением угловых градусов (5°–10°, а не 5–10°). Размерности переменных пишутся через запятую (E, кДж/моль), подлогарифмических величин – в круглых скобках без запятой: ln t (мин).

Специальные символы и цифры. Для печати специальных символов (греческие буквы, математические символы, графические символы и т.п.) следует использовать функцию Insert Symbol в редакторе Microsoft Word. Десятичные доли в числах отделяются точкой (3.14, а не 3,14).

Репринты. После выхода журнала издательство высылает авторам бесплатно PDF-файлы русской и английской версии статьи.

Адрес редакции: 117997, Москва, ул.Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, корп. 32, комн. 411, редакция журнала Биологические мембраны. Телефон редакции: 8(499)724-80-89. E-mail: biomembranes2010@gmail.com.

ПРАВИЛА

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сокращения часто употребляемых слов и терминов

БЛМ	Бислойные (бимолекулярные) липидные	н.	Нормальный (раствор)
	мембраны		
втор-	Вторичный	OE	Оптическая единица
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная	ΠΑΑΓ	Полиакриламидный гель
	хроматография		
ГЖХ	Газожидкостная хроматография	п. о.	Пары оснований
ед. акт.	Единица активности	т. п. о.	Тысяча пар оснований
ИК	Инфракрасный	т. кип.	Температура кипения
КД	Круговой дихроизм	т. пл.	Температура плавления
KP	Комбинационное рассеяние	mpem-	Третичный
KCCB	Константа спин-спинового взаимодействия	TCX	Хроматография в тонком слое
ME	Международная единица	УΦ	Ультрафиолетовый
м-, о-, п-	мета-, орто-, пара-	ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
Н	Нормальный (изомер)	ЯМР	Ядерный магнитный резонанс

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота	FAD	Флавинадениндинуклеотид
ДНКаза	Дезоксирибонуклеаза	FCCP	Карбонилцианид-4-трифторметокси- фенилгидразон
РНК	Рибонуклеиновая кислота	FMN	Флавинмононуклеотид
РНКаза	Рибонуклеаза	GA	Грамицидин А
Трис	Трис(оксиметил)аминометан	Gpp(NH)p	Гуанозин-5'-(Р,у-имидо)трифосфат
ADP	Аденозин-5'-дифосфат	HEPES	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пипера- зинэтансульфоновая кислота
AMP	Аденозин-5'-фосфат	MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
cAMP	Аденозин-3',5'-циклофосфат	MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
ANS	1-Анилинонафталин-8-сульфонат	NAD, NAD+, NADH	Никотинамидадениндинуклеотид и его окисленная и восстановленная формы
ATP	Аденозин-5'-трифосфат	NADI, NADP+, NADPH	Никотинамидадениндинуклеотид- фосфат и его окисленная и восстановленная формы
АТР-аза	Аденозинтрифосфатаза	P _i	Неорганический фосфат
СССР	Карбонилцианид- <i>м</i> -хлорфенилгид- разон	PP _i	Неорганический пирофосфат
СМ-целлюлоза	Карбоксиметилцеллюлоза	poly(A)	(3'-5')Поли(адениловая кислота)
Con A	Конканавалин А	POPOP	1,4-Бис[2-(5-фенил)оксазолил]бензол
DCC	N,N'-дициклогексилкарбодиимид	PPO	2,5-Дифенилоксазол
DEAE-целлюлоза	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	SDS	Додецилсульфат натрия
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота	TAPS	3-{[2-Гидрокси-1,1-бис(гидрокси-
EGTA	Этиленгликольбис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота		метил)этил]амино}-1-пропансульфо- новая кислота

ПРАВИЛА

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Символы для некотор	рых физич	еских и хим	лических ве	личин и ел	инины их	измерения
спыролы для пексто	pbin phon		in reenin be.	ли ши и од	ппцы пл	nomepennin

Символ	Величина	Единица измерения	
m	Macca	г, мг, мкг и т.д.	
М	Молекулярная масса	Да ^а (дальтон)	
M_r	Относительная молекулярная масса	безразмерная	
с _в или [B]	Концентрация вещества В	М (моль/л), мМ и т.д.	
n	Количество вещества	моль, нмоль, мкмоль и т.д.	
S	Коэффициент седиментации	S (сведберг, 10 ⁻¹³ с)	
Т	Термодинамическая температура	К ^б (кельвин)	
t	Температура по Цельсию	°C	
Ε	Энергия	Дж или кал (4.1868 Дж)	
Р	Давление	Па (паскаль), или атм (101325 Па), или мм рт. ст. (133.2 Па)	
Ι	Ионная сила	М, мМ и т.д.	
Ι	Интенсивность излучения	безразмерная	
Α	Поглощение ^в ($-\lg I/I_0$)	безразмерная	
ε	Молярный коэффициент поглощения ^г	$\mathrm{M}^{-1}\mathrm{cm}^{-1}$	
λ	Длина волны	НМ	
Le	Радиоактивность (излучательная способность)	Бк (беккерель, с ⁻¹) или Ки (3.7 × 10 ¹⁰ Бк)	
t	Время	с (не сек), мин, ч (не час), сут (не сутки)	
V	Объем	дм ³ (л), см ³ (мл), мкл и т.д.	
Κ	Константа равновесия	моль/л	
K _m	Константа Михаэлиса	М, мМ	
K_s	Субстратная константа	То же	
K _i	Константа ингибирования	»	
k	Константа скорости	с ⁻¹ или М ⁻¹ с ⁻¹	
k _{кат}	Каталитическая константа	c ⁻¹	
V	Скорость превращения	моль/с	
<i>V</i> или <i>V</i> _{max}	Максимальная скорость	моль л $^{-1}$ C $^{-1}$	
<i>h</i> или <i>n</i> _H	Коэффициент Хилла	безразмерный	
U	Напряжение	В (вольт)	
Ι	Сила тока	А (ампер)	
С	Емкость	Ф (фарада)	
R	Сопротивление	Ом	
G	Проводимость	См (сименс)	
$\Delta\mu_{H^+}$	Градиент электрохимического потенциала	В (вольт)	
$\Delta \psi$	Разность электрических потенциалов на мембране	В (вольт)	
E , или V_m , или $\Delta \phi$	Мембранный потенциал	В (вольт)	

^а 1/12 массы чистого изотопа ¹²С.

^б Не °К.

^в Англ. "absorbance" – поглощательная способность.

^г Термин "экстинкция" употреблять не рекомендуется.