СОДЕРЖАНИЕ

Том 38, номер 6, 2021

Рецепторы и внутриклеточная сигнализация 2021. Итоги конференции

В. П. Зинченко 401

ОБЗОРЫ

Роль p53-зависимых сигнальных путей в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении периферической нервной системы

С. В. Родькин, В. А. Дзреян, С. В. Демьяненко, А. Б. Узденский 402

***

Участие переносчика фосфата в ионофорном разобщающем действии ω-гидроксипальмитиновой кислоты в митохондриях печени

М. В. Дубинин, А. А. Семенова, О. Э. Краснощекова, В. Н. Самарцев 418

Инсулин способствует нормализации ионного гомеостаза и состояния митохондрий после механической травмы культуры нейронов мозга

И. А. Красильникова, И. А. Помыткин, В. Г. Пинелис, А. М. Сурин 427

Роль активности киназы гликогенсинтазы 3 в регуляции митохондриального биогенеза в постуральной мышце крысы в условиях антиортостатического вывешивания

И. Д. Львова, К. А. Шарло, С. В. Рожков, Т. М. Мирзоев, Б. С. Шенкман 434

Секреция ацетилхолина в моторных синапсах мыши. Изменение пуринергической регуляции в условиях фармакологической блокады Паннексина 1 и при его генетическом нокауте

А. С. Митева, А. Е. Гайдуков, О. П. Балезина 440

Нарушение деформационных и функциональных характеристик эритроцитов у больных с V стадией хронической болезни почек

Ю. С. Судницына, Е. А. Скверчинская, И. М. Зубина, Е. Д. Суглобова, Т. Д. Власов, А. В. Смирнов, А. Н. Васильев, Т. О. Ружникова, Б. А. Калюжный, И. В. Миндукшев, Ю. А. Борисов 450

Антитромбоцитарный эффект нобилетина опосредован активацией аденозинового рецептора A_{2A}

В. С. Шпакова, А. В. Авдеева, Н. Аль Араве, А. М. Прилепская, С. П. Гамбарян, Е. С. Алексеева, Н. И. Рукояткина 464

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Анализ клеточных ответов на норадреналин с использованием синхронного мониторинга Ca^{2+} и cAMP в клетках HEK 293

Е. Н. Кочкина, О. А. Рогачевская, П. Д. Котова 474

Поправка 478

Contents

Vol. 38, No. 6, 2021

Special Issue *Receptors and Intracellular signaling*
Publication editor, V. P. Zinchenko

Receptors and Intracellular Signaling 2021. Conference Overview
V. P. Zinchenko 401

REVIEWS

Role of p53-dependent Signal Pathways in Survival and Death of Neurons and Glial Cells in Damage of the Peripheral Nervous System
S. V. Rodkin, V. A. Dzreyan, S. V. Demyanenko, A. B. Uzdensky 402

***

The Role of the Phosphate Carrier in the Ionophore Uncoupling Action of ω-Hydroxypalmitic Acid in Liver Mitochondria
M. V. Dubinin, A. A. Semenova, O. E. Krasnoshchekova, V. N. Samartsev 418

Insulin Normalizes Ionic Homeostasis and the State of Mitochondria during Mechanical Trauma to the Culture of Brain Neurons
I. A. Krasilnikova, I. A. Pomytkin, V. G. Pinelis, A. M. Surin 427

The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis in Rat Postural Muscle under Hindlimb Unloading
I. D. Lvova, K. A. Sharlo, S. V. Rozhkov, T. M. Mirzoev, B. S. Shenkman 434

Acetylcholine Secretion in Mouse Motor Synapses. Changes of Purinergic Regulation in the Conditions of Pharmacological Blockade of Pannexin 1 and Its Genetic Knockout
A. S. Miteva, A. E. Gaydukov, O. P. Balezina 440

Alterations in Erythrocyte Deformability and Functions in End-Stage Renal Disease
J. S. Sudnitsyna, E. A. Skverchinskaya, I. M. Zubina, E. D. Suglobova, T. D. Vlasov, A. V. Smirnov, A. V. Vasiliev, T. O. Ruzhnikova, B. A. Kaljuzhnyi, I. V. Mindukshev, Yu. A. Borisov 450

Antiplatelet Effect of Nobiletin is Mediated by Activation of A2A Adenosine Receptor
V. S. Shpakova, A. V. Avdeeva, N. Al. Arawe, A. M. Prilepskaya, S. P. Gambaryan, E. S. Alekseeva, N. I. Rukoyatkina 464

SHORT COMMUNICATIONS

Responsiveness of HEK 293 Cells to Norepinephrine Analyzed by the On-line Monitoring of Intracellular Ca^{2+} and cAMP
E. N. Kochkina, O. A. Rogachevskaja, P. D. Kotova 474

Erratum 478

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ 2021. ИТОГИ КОНФЕРЕНЦИИ

DOI: 10.31857/S023347552106013X

24–28 мая 2021 г. в Пущино на базе Института биофизики клетки Российской академии наук Федерального исследовательского центра ПНЦБИ РАН проходила 11-я Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”. Несмотря на продолжающуюся пандемию, на конференцию приехало много истосковавшихся по живому общению научных сотрудников и аспирантов. Высокий уровень конференции был задан пленарными докладами ведущих ученых. Большой интерес участников вызвали также мастер-классы, организованные известными производителями научного оборудования, в частности фирмой Квадрос-Био, специализирующейся на методах измерения активности клеток в культуре и анализа экспрессии генов в одиночных клетках.

Из 426 авторов поданных материалов очно в работе конференции приняло участие 128 человек из 18 городов, 37 институтов и 4 стран. На конференции было представлено 64 устных доклада и обсуждено 73 постерных сообщения. Программа конференции включала ежедневные обзорные пленарные доклады приглашенных ведущих ученых, посвященные новейшим достижениям в различных областях биологии, биотехнологии, фармакологии и экспериментальной медицины. Большинство пленарных докладов были посвящены фундаментальным механизмам функционирования клеток при различных патологиях. Наиболее интересными стали доклады Н.В. Гончарова “Эндотелий сосудов в патогенезе нейродегенеративных заболеваний”, А.Ю. Абрамова “Роль NRF2 в энергетическом метаболизме”, А.В. Семьянова “Нейрон-глиальные взаимодействия в головном мозге”, Е.А. Туровского “Кальций-зависимые механизмы активации защитных сигнальных путей нейронов головного мозга при гипоксии и ишемии”.

На конференции широко обсуждались молекулярные механизмы управления функциональной активностью клеток в норме и при различных патологиях. В частности, представлены данные о новых рецептор-зависимых механизмах управления активностью макрофагов, нейтрофилов и тромбоцитов при воспалении. Традиционно были доложены результаты работ, выполненных на клетках мозга, сердца и почек, которые посвящены исследованиям сигнализации при апоптозе в условиях стресса и ишемии. При этом показаны новые механизмы толерантности различных типов клеток и тканей к ишемии и приведены данные о механизмах повреждения и защиты клеток при этих патологиях. Показаны новые способы усиления и торможения продукции активных форм кислорода селективно в нормальных и опухолевых клетках.

Конференция показала возросшее количество исследований, направленных на изучение нейродегенеративных процессов в мозге. При этом рассматривались вопросы контроля возбуждения и торможения в нейрональной сети, механизмы синхронизации активности нейронов при эпилепсии, нейро-глиальные взаимодействия в мозге, механизмы активации защитных эндогенных сигнальных путей нейронов мозга при гипоксии и ишемии.

Среди исследований физиологически активных соединений, воздействующих на механизмы внутриклеточной сигнализации, следует отметить работы по модификации и применению природных антиоксидантов для защиты клеток от повреждений.

Конференция показала, что механизмы управления функциональной активностью клеток и сегодня находятся в центре внимания ученых разных областей биологии и медицины.

Избранные материалы конференции представлены в форме статей в специальном выпуске журнала “Биологические мембраны”, который и представляется вашему вниманию.

Председатель Оргкомитета конференции
В.П. Зинченко

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 402–417

ОБЗОРЫ

УДК 576.3+576.32/36

РОЛЬ p53-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ВЫЖИВАНИИ И ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2021 г. С. В. Родькин[a], *, В. А. Дзреян[a], С. В. Демьяненко[a], А. Б. Узденский[a]

[a]*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии, лаборатория "Молекулярная нейробиология", Ростов-на-Дону, 344090 Россия*

**e-mail: rodkin_stas@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.
После доработки 27.03.2021 г.
Принята к публикации 29.03.2021 г.

Нейротравма – одна из основных причин инвалидности и смертности людей. Тем не менее механизмы, которые опосредуют выживание и смерть клеток периферической нервной системы, до сих пор до конца не изучены. Белок p53, известный как опухолевый супрессор, является мастер-регулятором основных клеточных процессов, включая репарацию ДНК, прохождение клеточного цикла, метаболизм и апоптоз. Гиперэкспрессия p53, показанная в ряде экспериментальных моделей травмы периферических нервов, позволяет предположить важную роль этого белка в патогенезе нейротравм. В настоящем обзоре рассмотрены сигнальные и эпигенетические механизмы активации и регуляции p53, которые могут способствовать выживанию или гибели нейронов и глиальных клеток после травматического повреждения. Рассмотрены перспективы дальнейших исследований механизмов регуляции белка p53, в том числе с участием гистондеацетилаз, для разработки нейропротекторов.

Ключевые слова: аксотомия, нейрон, глиальные клетки, апоптоз, p53

DOI: 10.31857/S0233475521060098

ВВЕДЕНИЕ. ПРОБЛЕМЫ ТЕРАПИИ НЕЙРОТРАВМ

Травмы периферических нервов (ТПН) – одна из распространенных причин инвалидизации и смертности населения во всем мире [1–3]. Гетерогенность ТПН создает дополнительные трудности их исследования, а также сложности в диагностике и подборе правильного лечения [2].

Ряд работ повествуют о роли p53 как транскрипционного фактора, определяющего судьбу клетки и имеющего центральную значимость в патофизиологии инсульта и при травматических повреждениях головного и спинного мозга [4, 5], однако лишь в нескольких работах непосредственно исследовалась роль p53 в гибели и выживаемости нейронов периферической нервной системы. Гиперэкспрессия p53 в ряде экспериментальных моделей ТПН [6–12] позволяет предположить важную роль этого белка в их патогенезе.

Механизмы активации и регуляции p53 при нейротравмах на сегодняшний день изучены относительно слабо [13], но данная область исследований тем не менее представляется перспективной. Новые результаты позволят улучшить современное понимание структурных и функциональных изменений, вызываемых ТПН, а также будут способствовать разработке более эффективных подходов к терапевтическому вмешательству и восстановлению после нейротравм.

В связи с этим целью настоящего обзора явился анализ современных данных, указывающих на ключевую роль белка p53 в патогенезе ТПН. Опираясь в том числе и на результаты, полученные в нашей лаборатории, мы попытаемся разобрать вопросы, связанные с механизмами активации и сложной системой регуляции p53 в нейронах и глиальных клетках после аксотомии, а также затронем потенциальные терапевтические последствия воздействия на активность p53 в условиях нейротравмы.

СТРУКТУРА БЕЛКА p53

Белок p53 играет важную роль во внутриклеточной сигналиазации, регулируя клеточный цикл и транскрипцию множества генов, поэтому неудивительно, что p53 имеет сложную структурную организацию (рис. 1) [14]. Структура p53 имеет модульную доменную архитектонику, состоящую из ДНК-связывающих и тетрамериза-

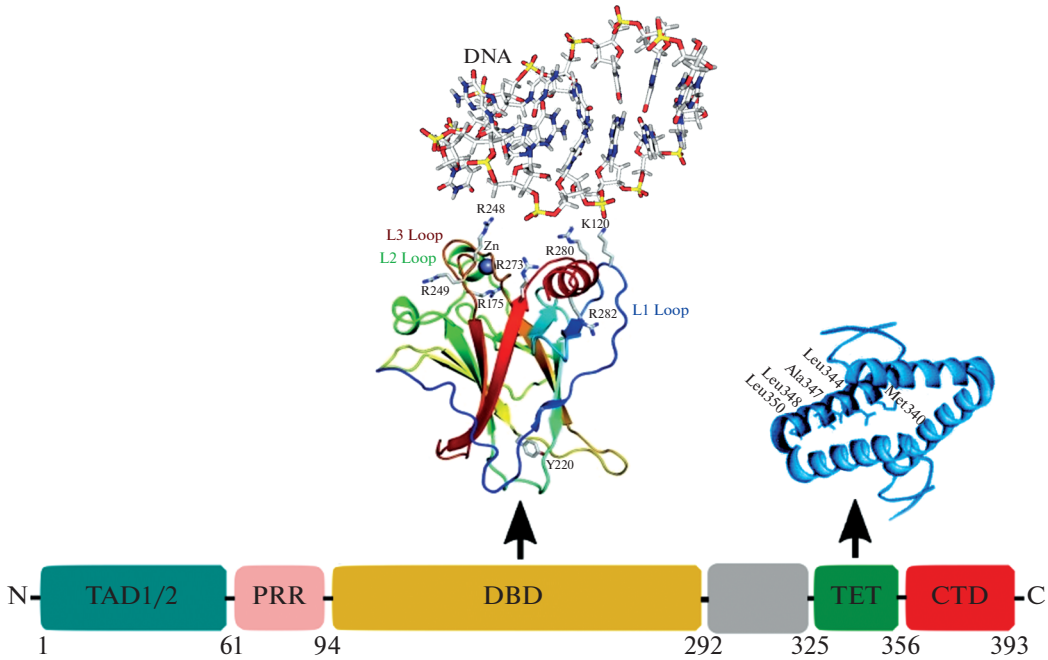

Рис. 1. Схема строения p53. Структура p53 включает в себя трансактивационный домен, состоящий из двух субдоменов TAD1 и TAD2, за которыми располагается область, насыщенная пролином (PRR), ДНК-связывающего центрального домена (DBD), образованного иммуноглобулин-подобным β-сэндвич-каркасом и расположенной на его конце ДНК-связывающей поверхностью, а также домена тетрамеризации и С-концевого домена CTD, регулирующим активность p53.

ционных доменов, включающих внутренне неупорядоченные участки на С- и N-концах (рис. 1). В активной форме p53 представляет собой тетрамер, каждый мономер которого состоит из доменов с различной степенью структурной стабильности, начиная от хорошо свернутого ДНК-связывающего домена (DNA-binding domain, DBD) и домена тетрамеризации (tetramerization domain, TET), до внутренне неупорядоченного трансактивирующего домена (transactivation domain, TAD) и крайнего С-концевого домена (C-terminal domain, CTD) [14–17].

Основной ДНК-связывающий домен (DBD) состоит из центрального иммуноглобулин-подобного β-сэндвича и расположенной на его конце ДНК-связывающей поверхности, сформированной двумя большими петлями (L2 и L3) и мотивом “петля–лист–спираль” (loop-sheet-helix) [18]. Ион цинка, тетраэдрически координированный в позициях Cys176, His179, Cys238 и Cys242, стабилизирует области L2 и L3 [19]. Внутренняя термодинамическая стабильность DBD находится на относительно низком уровне, поскольку основной домен p53 имеет достаточно невысокую температуру плавления (44°C). Было показано, что низкая термодинамическая и кинетическая стабильность DBD обеспечивает быстрое изменение конформации p53 из свернутого в развернутое состояние и обратно, тем самым обеспечивая его дополнительную регуляцию в сочетании с убиквитин-протеасомной деградацией. Также это свойство DBD делает структуру p53 пластичной, обусловливая его более эффективное связывание с различными белками [20, 21].

Полноразмерный домен TAD p53 состоит из двух N-концевых субдоменов TAD1 (аминокислотные остатки 1–42) и TAD2 (аминокислотные остатки 43–73) и имеет суммарный заряд –17 из-за наличия в своей структуре большого количества кислых аминокислот (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), перемежающихся с объемными гидрофобными участками. TAD входит в семейство “кислых” доменов активации (acidic activation domain, AAD) [21]. Сайт активации транскрипции располагается в пределах аминокислотных остатков 1–42. TAD не имеет третичной структуры, что характерно для большинства AAD, однако содержит α-спираль и два амфипатических витка [22]. В несвязанном состоянии TAD легко расщепляется протеазами, что свидетельствует о его слабой конформации. Возможно, низкая молекулярная организация TAD делает его структуру более пластичной, способствуя взаимодействию со множеством белков и облегчая его посттрансляционную модификацию различными ферментами. Основная функция TAD заключается в про-апоптотической транскрипции множества генов, однако было показано, что TAD

также участвует и в процессах репарации ДНК [18–21].

На С-конце p53 между 311-м и 363-м аминокислотными остатками располагается домен TET, ответственный за тетрамеризацию, мономеры которого содержат β-цепь, связанную с α-спиралью одним аминокислотным остатком [22]. Исследования показали, что TET представляет собой димер димера. Два димера взаимодействуют между собой через свои α-спирали, а β-цепи располагаются на внешней стороне тетрамера, не принимая непосредственного участия в их ассоциации [23].

С-концевой домен (CTD) p53 представляет собой внутренне неупорядоченную область, меняющую свою конформацию в зависимости от ассоциации с белками-партнерами благодаря гибкой структуре, большой площади поверхности и экспонированию пептидных сайтов, обладающих функциями молекулярного распознавания. Недавние исследования показали, что CTD регулирует активность p53, в частности, обеспечивая отрицательный контроль над ДНК-связывающей способностью данного белка [23, 24].

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКА p53

Выделен целый ряд состояний, способных активировать p53: истощение запасов нуклеотидов, нарушения цитоскелета, нарушения биогенеза рибосом, гипоксия и ишемия, гипероксия, отсутствие или избыток некоторых факторов роста или цитокинов, нарушения клеточной адгезии и фокальных контактов, нарушение прикрепления клеток к субстрату (что сопровождается p53-зависимым аноикисом), действие монооксида азота (NO) и многое другое. Все эти состояния вызывают характерные для каждого из них модификации как самого белка p53, так и сигнальных систем, контролирующих его уровень и активность.

Ген *p53* независимо от условий транскрибируется в клетке с постоянной интенсивностью, однако его транскрипты обладают исключительно коротким временем жизни, что достигается благодаря быстрой и непрерывной деградации в результате убиквитинирования белками MDM2 и MDMX. Дополнительный контроль функции p53 осуществляется посредством посттрансляционных модификаций (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и другие), а также посредством взаимодействия с белками-партнерами.

Деградация и стабилизация p53

E3-убиквитин-протеиновая лигаза MDM2 – основной отрицательный регулятор белка p53, катализирующий перенос активированного убиквитина с фермента группы E2 на белок p53 [25]. При этом сам фермент MDM2 является продуктом гена, активируемого p53. Поскольку MDM2 является транскрипционной мишенью p53, MDM2-зависимая регуляция p53 существует в петле обратной связи, которая контролирует конститутивно низкую экспрессию p53 в нормальных условиях. Кроме того, MDM2 может быть важен для контроля кратковременного повышения уровня p53, необходимого, например, для восстановления ДНК после легкого генотоксического стресса без риска фатальных последствий чрезмерной активации p53. Все больше данных свидетельствуют о том, что MDM2 участвует в регуляции p53-зависимой гибели клеток в нейронах. В частности, повышение уровня MDM2 было обнаружено в ткани головного мозга при ишемии, где его отрицательная регуляция активности p53 важна для последующей репарации [26].

Процесс взаимодействия p53 с белком MDM2 тонко регулируется за счет множества механизмов, направленных как на регуляцию активности MDM2, так и на модификации его мишени – самого белка p53. Этот центральный регуляторный механизм дополнительно контролируется рядом других белков, таких как MDMX, опухолевым супрессором ARF и HAUSP [27].

MDMX (MDM4) также представляет собой белок, связывающий p53 и имеющий структурное сходство с MDM2, но, в отличие от MDM2, не обладающий убиквитинлигазной активностью. MDMX связывается с N-концевой областью p53, подавляя его транскрипционную активность, но не вызывает его разрушения. MDMX также способен гетероолигомеризоваться с MDM2, что приводит к ускорению разрушения MDMX и стабилизации MDM2. Таким образом, изменение соотношений этих двух белков может тонко регулировать количество и активность p53 [25–27].

Образование комплексов p53 с белками MDM2 и MDMX также тщательно регулируется. Например, рибосомные белки (L5, L11 и L23) связываются с MDM2, подавляют его активность в отношении p53 и одновременно стимулируют разрушение MDMX, что приводит к активации p53 в ответ на рибосомальный стресс [26].

Кроме того, важными отрицательными регуляторами MDM2 являются белок p19ARF и человеческий гомолог белка p14ARF, которые связываются с MDM2 и нейтрализуют его, тем самым повышая активность p53. В первичных нейронах накопление p19ARF и p53 происходило после NO-опосредованного апоптотического стресса через путь p21ras-MAPK [27].

Недавние исследования показали, что нарушение функции ядрышка может выступать в качестве важного датчика стресса, повышающего стабильность p53, вероятно, за счет повышения уровня p19ARF. Поскольку разрушение ядрышек достаточно, чтобы вызвать p53-зависимый апо-

птоз, предполагается, что именно оно выступает в качестве ключевого механизма интеграции всех известных стимулов активации p53, но это пока не до конца изучено в нейронах и остается лишь предположением [25–27].

Транскрипция ARF-белков положительно и отрицательно контролируется комплексами, содержащими транскрипционный фактор E2F1. В свою очередь, его экспрессия контролируется MAP-киназой p38 и фактором транскрипции c-Myc [25].

Модификация активности белка MDM2 также происходит и при его связывании с белком-активатором транскрипции p300/CBP, что приводит к переключению способности MDM2 с моноубиквитинирования на полиубиквитинирование p53, которое необходимо для его узнавания 26S-протеасомами и разрушения белка. Полиубиквитилирование p53, в отличие от моноубиквитирования, приводит к протеасомной деградации p53 в цитоплазме. Большая часть моноубиквитилированного p53 направляется в митохондрии [26–28].

Белок MDM2, так же как и p53, сам подвергается разрушению в 26S-протеасомах, но этот процесс может регулироваться за счет специальных ферментов, удаляющих убиквитиновые остатки. Установлено, что белок HAUSP, который также известен как убиквитин-специфическая протеаза 7 (USP7), является одним из таких ферментов. Он удаляет убиквитин с белка MDM2, в то время как другой белок Daxx образует комплекс с MDM2 и HAUSP и предотвращает самоубиквитинирование MDM2, что приводит к его стабилизации и ускорению разрушения p53. Кроме того, p53 может подвергаться деубиквитинированию с помощью белка HAUSP, который, оказывая противоположные эффекты на систему разрушения p53, способствует тонкой регуляции его активности [25].

Кроме того, обнаружено несколько других убиквитиновых лигаз E3, включая ARF-BP1/Mule, COP1, Pirh2 и MSL2, которые могут убиквитинировать p53, вызывая деградацию белка или изменение его субклеточной локализации. Однако биологическое значение этих результатов *in vivo* еще предстоит выяснить [27].

Белковая молекула p53 имеет неструктурированные участки в N- и C-концевых областях, что обусловливает ее разрушение по убиквитин-независимому пути в 20S-протеасомах. Данный процесс регулируется NAD(P)H-зависимой хиноновой оксидоредуктазой NQO1, которая при наличии NADH связывается с такими белками и предотвращает их разрушение в 20S-протеасомах [26].

Таким образом, многоуровневый подход к регулированию уровней p53 и MDM2 может обеспечить дополнительную защиту клетки от активации сигнального пути p53 [25–28].

Посттрансляционные модификации p53

Уровень белка p53 поддерживается на низком уровне в большинстве типов клеток, включая нейроны, благодаря тонким механизмам, обеспечивающим жесткую регуляцию его активности [25]. Такая динамическая регуляция определяет содержание белка в клетке, субклеточную локализацию, посттрансляционные модификации и партнеров по связыванию [29, 30]. Эти свойства впоследствии формируют необходимую скорость, интенсивность и продолжительность активации p53, а также его предпочтение отдельным транскрипционным мишеням, определяя, таким образом, возможные биологические ответы. Поэтому актуальным остается исследование механизмов регуляции белка p53 в процессах нейродегенерации и нейропротекции.

После повреждения ДНК или клеточного стресса p53 активируется посредством множества посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование и/или метилирование, а также введении остатков убиквитина и убиквитин-подобных белков SUMO и NEDD8 [30]. Такие модификации либо увеличивают стабильность p53, либо напрямую усиливают аффинность его связывания с ДНК. Перечисленные посттрансляционные модификации p53 могут варьироваться между популяциями нейронов, зависеть от типа и тяжести генотоксического стресса и могут изменяться в процессе развития и старения [25].

Описано более 20 сайтов в молекуле p53, подвергающихся ковалентным модификациям. Большая часть из них располагается в N- и C-концевых сегментах p53. Множество белков, взаимодействуя с p53, вносят ковалентные модификации в его структуру [25]. К таким белкам относится более 30 различных протеинкиназ, несколько протеинфосфатаз, несколько убиквитиновых лигаз и белков, регулирующих взаимодействие p53 с E3-лигазами, деубиквитинирующие белки, белки, осуществляющие связывание с SUMO и NEDD8, несколько метилаз, ряд ацетилтрансфераз и деацетилирующих ферментов. Фосфорилирование p53 в области его N-конца способствует дегенерации двигательных нейронов [25].

Модификации в области N-конца p53 (например, фосфорилирование Ser15, Ser20, Thr18) также могут препятствовать его связыванию с MDM2 и другими E3-лигазами, стабилизируя белок. Кроме того, за счет модификаций p53 происходит модуляция его способности взаимодействовать с коактиваторами и корепрессорами транскрипционного аппарата, а также изменение

предпочтений в связывании с p53-респонсивными элементами тех или иных генов. Разнообразные модификации С-концевых участков p53 (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, пришивание убиквитин-подобных белков SUMO и NEDD8) приводят к нейтрализации ингибирующего действия С-концевого сегмента, к дальнейшей стабилизации p53, как позитивной, так и негативной модуляции его активности и к изменениям его внутриклеточной локализации [29, 30].

РАЗНООБРАЗИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ БЕЛКА p53

Белок p53 известен как опухолевый супрессор и “страж генома”. Он является регулятором важных функций клетки, включая репарацию ДНК, прохождение клеточного цикла, метаболизм и апоптоз [30–32]. В качестве фактора транскрипции p53 контролирует экспрессию множества генов, которые принимают участие в вышеперечисленных процессах [31, 33].

По последним данным, число генов, контролируемых белком p53, превышает 3000, хотя по более строгим оценкам число таких генов ограничено несколькими сотнями [33, 34]. Наряду с транскрипционно-зависимым путем регуляции, p53 принимает участие и в транскрипционно-независимых процессах, таких как регуляция функций митохондрий и запуск процессов апоптоза в клетках с митохондриальной дисфункцией [30–32].

Было продемонстрировано, что p53 в стрессовых условиях проникает в митохондрии и активирует экспрессию проапоптотических генов *PUMA*, *BAX*, *APAF-1*, *NOXA*, а также ингибирует экспрессию антиапоптотических генов семейства Bcl-2 (*BCL2*, *BCL-X*, *BCL-in*, *MCL1*). Эти проапоптотические белки вместе с p53 транспортируются в митохондрии, где они вызывают увеличение проницаемости внешней мембраны, что приводит к высвобождению цитохрома c и других апоптотических белков [35, 36].

Кроме того, в последние годы появилась информация о роли p53 в дифференцировке и пролиферации нервных стволовых клеток, а также в регуляции роста и регенерации аксонов [34]. Ингибирование p53 блокирует фактор роста нервов (NGF). В клетках, подвергшихся действию NGF, был обнаружен рост уровня p53 и снижение экспрессии E3-убиквитин лигазы MDM2, которая маркирует p53 для его последующей протеасомной деградации. Кроме того, показано, что p53 активирует транскрипцию ряда генов, ответственных за перестройку цитоскелета. Как в нейронах коры головного мозга, так и в нейронах дорзальных ганглиев p53 активирует экспрессию cGMP-зависимой киназы cGKI, противодействующей коллапсу конуса роста. У мышей с нулевым уровнем p53 наблюдается нарушение регенерации аксонов после травмы лицевого нерва. Ряд других факторов транскрипции, включая NF-kB, которые важны для регенерации аксонов, могут потенциально пересекаться с p53-зависимыми сигнальными путями [34, 35].

В нормальных клетках экспрессия p53 обычно находится на низком уровне благодаря протеолизу, но в условиях стресса и при множественном повреждении ДНК экспрессия p53 повышается [4]. Ряд работ демонстрирует активацию p53 в различных экспериментальных моделях повреждения нервов [5, 35–37]. Кроме того, фармакологическое или генетическое ингибирование p53 чаще всего предотвращает гибель нейронов, а гиперактивация сигнального пути p53 обычно стимулирует нейродегенерацию. Это указывает на ключевую роль p53 в регуляции жизнеспособности нейронов после повреждения [30–32, 35, 36]. Однако роль p53 в гибели нейронов и глиальных клеток при повреждениях периферической нервной системы недостаточно ясна и нуждается в дальнейших исследованиях.

Мы сосредоточили свое внимание на изучении роли белка p53 в гибели и выживании нервных клеток после аксотомии – на экспериментальных моделях повреждения периферических аксонов у беспозвоночных и млекопитающих.

УЧАСТИЕ p53 В ГИБЕЛИ И ВЫЖИВАНИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Нейротравма – одна из основных причин инвалидности и смертности людей в мире, особенно среди мужчин молодого и среднего возраста. Аксотомия относится к механическим повреждениям нервов и представляет собой полную перерезку нерва, инициирующую сложный каскад сигнальных и метаболических процессов, направленных на гибель или выживание нейрона [38–40].

Перерезка нерва (аксотомия) характеризуется тремя основными молекулярно-клеточными событиями: валлерова деградация отрезанного аксона, гибель поврежденного нейрона или его регенерация с отрастанием аксона и восстановлением нейронных связей [38]. Аксотомия вызывает нарушение целостности нейрональной мембраны, дестабилизацию клеточного гомеостаза, деструкцию микротрубочек, нарушение аксонального транспорта и повреждение внутриклеточных органелл [1]. При этом происходит активация и подавление множества белков в аксотомированных нейронах [1, 39]. Некоторые сигнальные белки ретроградно транспортируются к соме нейронов и стимулируют факторы транскрипции, чтобы инициировать экспрессию генов и синтез важных

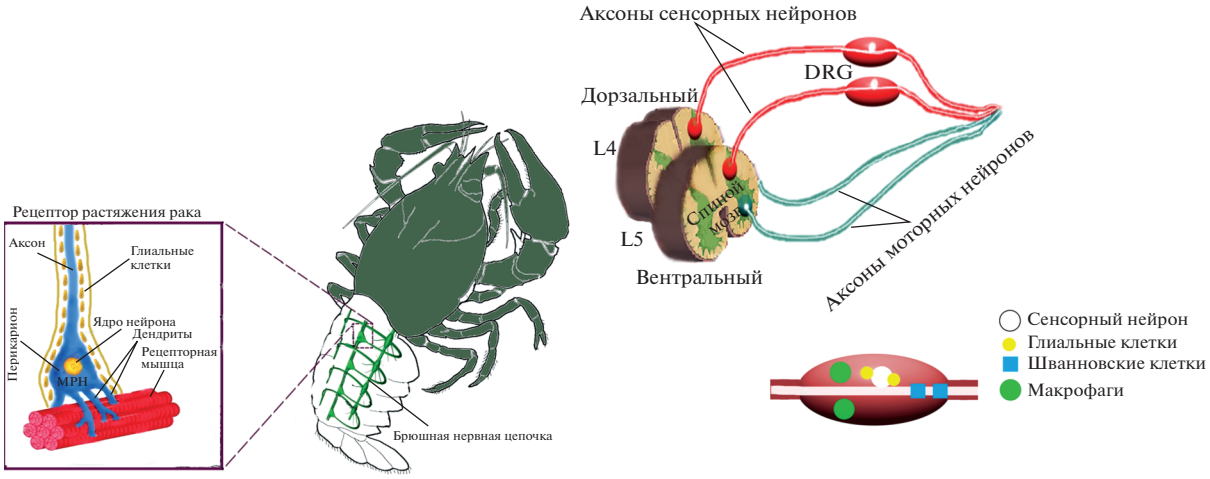

Рис. 2. Экспериментальные модели аксотомии: рецептор растяжения и брюшная нервная цепочка рака *Astacus leptodactylus*, а также дорзальные ганглии крысы.

белков, которые затем обратно транспортируются к поврежденному месту аксона для восстановления его структуры и ускорения процесса регенерации [39]. В конечном итоге регенерирующие аксоны в периферической нервной системе могут снова восстановить контакт со своей мишенью, однако многие нейроны погибают [40]. К сожалению, клинически эффективных нейропротекторов, которые могут спасти поврежденные нейроны при аксотомии, пока не найдено [1–3, 40, 41].

Отсутствие решающих успехов в этом направлении говорит о недостаточном понимании молекулярно-клеточных механизмов повреждения нервов и последующих вторичных процессов, приводящих к клеточной смерти или к регенерации нерва и восстановлению утраченных функций. Поэтому актуальны исследования молекулярно-клеточных механизмов повреждения периферической нервной системы на модельных объектах. Трудностью таких исследований является большое разнообразие повреждений нервной системы [42]. Разработано несколько моделей нейротравм. Это модели растяжения, механического или гидростатического сдавливания, гидродинамического удара, удара падающего груза, рассечения нерва (аксотомии) [42–44]. Использование этих моделей помогает выяснить комплексные механизмы разных видов нейротравмы, ведущие к смерти нейронов и глиальных клеток [44].

В своих работах мы использовали три экспериментальные модели нейротравмы в биологических объектах разного уровня сложности (рис. 2): 1) аксотомированные рецепторы растяжения речного рака (РРР); 2) аксотомированные ганглии вентральной нервной цепочки (ВНЦ) рака и 3) аксотомированные ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG), полученные при перерезке седалищного нерва [6, 7, 41, 45–50].

Рецептор растяжения речного рака является подходящим модельным объектом для изучения молекулярных механизмов нейрональных и глиальных ответов на аксотомию. Он состоит из одного механорецепторного нейрона (МРН), окруженного сателлитными глиальными клетками (СГК) (рис. 2).

На рис. 3 представлена схема участия изученных нами белков в некротической или апоптотической смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии МРН.

В своих работах мы использовали специфические ингибиторы для изучения роли таких белков, как: AMPK, mTOR , Akt, GSK-3β, MEK1/2, ERK1/2, p38 и JNK в индуцированном аксотомией некрозе и апоптозе СГК. СГК расположены на расстоянии нескольких миллиметров от места рассечения и окружают проксимальный сегмент аксона МРН [1]. Вначале рассмотрим литературные данные об участии данных систем в гибели клеток.

Увеличение внутриклеточного Ca^{2+} при аксотомии активирует протеинкиназу AMPK через сигнальный путь Ca^{2+}/CaMKKβ, что приводит к ингибированию высококонсервативной серин/треониновой протеинкиназы mTOR, входящей в качестве каталитической субъединицы в состав двух функционально различных гетерогенных комплексов mTORC1 и mTORC2 [51, 52]. Комплекс mTORC2 фосфорилирует киназу Akt – ключевой фермент сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, ответственного за выживание клетки [53–55]. С этим путем тесно связана гликогенсинтаза GSK-3β через Akt-опосредованное ингибирование. GSK-3β обладает противоположными эф-

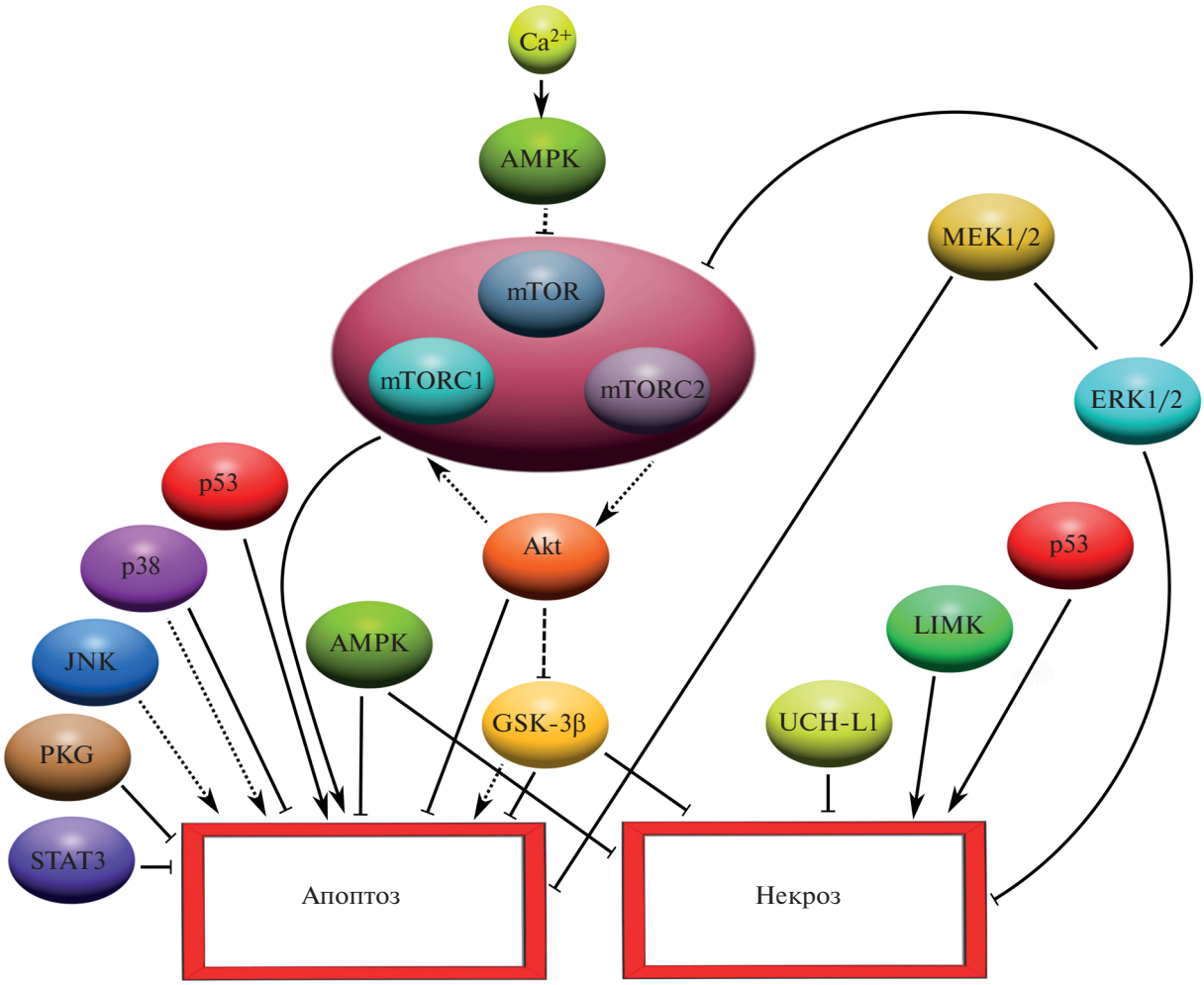

Рис. 3. Схема сигнальных путей, которые регулируют апоптоз и некроз глиальных клеток вокруг проксимального сегмента механорецепторного нейрона рака после аксотомии. Сплошные линии – собственные результаты, пунктирные линии – литературные данные. LIMK – актин-связывающая киназа LIM.

фектами, повышая или понижая порог инициации апоптотической клеточной смерти. Так, GSK-3β способствует гибели клетки, вызывая внутренний (митохондриальный) апоптоз, но ингибирует внешний, опосредованный рецепторами смерти, а также снижает риск некроза [56–67]. Akt ингибирует апоптоз на постмитохондриальном уровне без изменения экспрессии Bcl-2, Bcl-x или Bax через подавление каспазного каскада. В свою очередь, Akt активирует комплекс mTORC1, который активирует процессы апоптоза. Интересен также STAT3, сигнальный белок и активатор транскрипции, который обладает антиапоптотическим эффектом за счет регуляции экспрессии Bcl-xL, Bcl-2 и Mcl-1 [58]. Протеинкиназа G (PKG) регулирует апоптоз через фосфорилирование белка Bad. Протеинкиназа JNK и p38 практически во всех случаях связаны с индукцией апоптоза. Активация сигнального пути p38 приводит к множеству транскрипционных и трансляционных изменений, ведущих к запрограммированной гибели клетки [59]. Различные внутриклеточные и внеклеточные стрессовые факторы, включая аксотомию, приводят к стимуляции активности JNK. Данная киназа может перемещаться в кариоплазму, стимулируя множество проапоптотических факторов транскрипции [60, 61]. Особую роль в выживании и гибели клеток играет сигнальный путь MAPK RAS/RAF/MEK/ERK, активируемый широким спектром факторов роста и цитокинов.

Другой важный фермент, локализующийся преимущественно в нервной ткани, препятствующий некрозу нейроцитов и играющий центральную роль в поддержании жизнедеятельности и стабильности аксонов – убиквитин C-концевая гидролаза L1 (UCH-L1) [62]. Актин-связывающая киназа LIM, наоборот, увеличивает некроз глиальных клеток, вероятно, через сигнальный путь p21.

В наших исследованиях были выявлены некоторые несоответствия с данными литературы. Так, например, проапоптотическая MAP-киназа p38 в нашей работе проявляла антиапоптотические свойства в глиальных клетках речного рака. Ранее аналогичным образом была показана способность p38 защищать нейроны от NO-индуцированного апоптоза [63] и способствовать защите сердца от повреждения при реперфузии [64].

Обычно GSK-3β обладает проапоптотической активностью, а его ингибирование с помощью Akt подавляет апоптоз клеток. Однако после аксотомии МРН как Akt, так и GSK-3β могут участвовать в антиапоптотических процессах в СГК. Возможно, антиапоптотическая активность Akt связана с ингибированием проапоптотических белков Bad, Bim и каспазы-9, но не GSK-3β. Akt также может активировать mTORC1, который в наших экспериментах подавлял апоптоз [1].

Ингибирование AMP-активируемой протеинкиназы AMPK с помощью AICAR или дорсоморфина не влияло на некроз и апоптоз глиальных клеток после аксотомии. Скорее всего, уровень ATP в СГК не был настолько сильно нарушен, чтобы активировать AMPK после 8-часовой инкубации. Возможно, антиапоптотические процессы в сателлитных глиальных клетках после аксотомии МРН были связаны с каскадом Akt/mTORC1, а не с AMPK/mTOR [1].

Таким образом, белки MEK1/2, p38, Akt, GSK-3β и mTOR способствуют устойчивости глиальных клеток к апоптозу, индуцированному аксотомией. ERK1/2 и GSK-3β участвуют в защите СГК от вызванного аксотомией некроза. Поддержание выживания нейронов – одна из основных функций глиальных клеток нервной системы позвоночных. В РРР не только СГК способствуют выживанию нейронов, но и МРН поддерживает выживание глиальных клеток. Как именно поврежденный нейрон индуцирует защитные сигнальные пути в СГК, которые увеличивают их сопротивление, является проблемой для будущего исследования [1].

Также особый интерес заслуживает наше исследование по изучению локализации p53 в МРН рака и его роли в индуцированной аксотомией гибели СГК, удаленных от места рассечения аксона [6].

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что в интактном МРН, аксоны которых были не повреждены и сохраняли связь с ганглиями брюшной нервной цепочки, p53 главным образом концентрировался в ядрышке и узком цитоплазматическом кольце шириной 2–4 мкм, расположенном вокруг ядра (рис. 4). Уровень p53 в перикарионе и глиальных ядрах, в которых не наблюдалось ядрышко, был заметно ниже, а в аксоне полностью отсутствовал. Перерезка аксона приводила к увеличению иммунофлуоресценции p53 через 4 и 8 ч в кариоплазме нейронов и глиальных клеток, в перикарионе МРН. При этом перинуклеарное кольцо не исчезало, а становилось более выраженным и интенсивным по сравнению с интактными нейроглиальными препаратами [6].

Проведенный ингибиторный анализ *in vivo* на нейронах РРР с использованием активаторов и ингибиторов p53 позволил сделать выводы о механизме участия p53 в апоптозе глиальных клеток [6]. Индуцированный аксотомией апоптоз отдаленных глиальных клеток усиливается в присутствии активаторов p53 WR-1065 и нутлина-3, но снижается пифитрином-α, который ингибирует транскрипционную активность p53 [6, 65]. Пифитрин-μ, который ингибирует действие p53 на митохондрии, увеличивал индуцированный аксотомией апоптоз удаленных глиальных клеток, но уменьшал их некроз. Следовательно, индуцированный аксотомией апоптоз удаленных глиальных клеток был связан с эффектом p53 на процессы транскрипции, тогда как глиальный некроз был скорее связан с независимым от транскрипции эффектом p53 на митохондрии. По-видимому, судьба удаленных глиальных клеток в аксотомированном РРР определяется балансом между различными модальностями активности p53 [6, 65].

Протеомные исследования показали, что через 1–3 ч после двусторонней аксотомии в вентральных ганглиях речного рака наряду с повышением белка p53 наблюдается гиперэкспрессия нескольких десятков важнейших белков, участвующих в ключевых клеточных процессах [50]. Это белки внутриклеточной сигнализации: p38, JNK, ERK1 и ERK2, RAF1, PKCα, MAPKAPK2, MKP-1, кальмодулин, APP; белки, участвующие в инициации, реализации и регуляции апоптоза: факторы транскрипции c-Myc, E2F1, p53; белки Bcl-10, GADD153, AIF, SMAC/DIABLO, каспазы 3, 6, 7 и 11; многофункциональные белки, способные инициировать апоптоз в определенных ситуациях: PAR4, NGFR, p75, NMDAR2a. Одновременно повышался уровень антиапоптотических белков: Bcl-x, p21, MDM2, ERK5, рецепторов эстрогенов. Повышался уровень некоторых белков, участвующих в перестройках актинового цитоскелета: кофилина, миозина II и Va, α-катенина, катенина p120CTN, p35. Вместе с тем другие, связанные с актином белки, такие как эзрин, дистрофин, тропомиозин, спектрин (α + β), фосфорилированный Pyk2 подавлялись. Различные цитокератины и βIV-тубулин, компоненты промежуточных филаментов и микротрубочек, также были подавлены, что могло быть результатом разрушения ткани. Подавление белков, участвующих в образовании клатриновых везикул (AP2α и AP2γ, адаптина (β1 + β2) и синтаксина), указывает на нарушение везикулярного транспорта, а ферментов синтеза

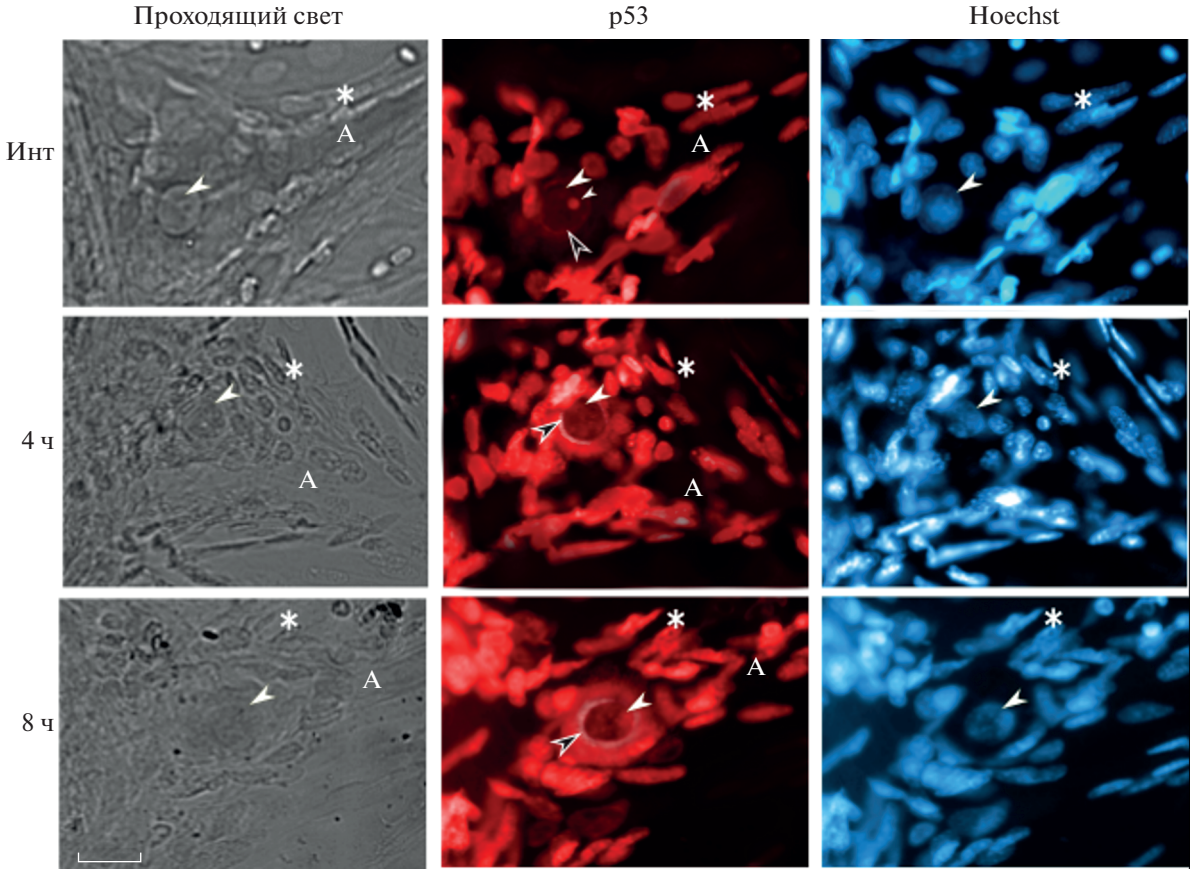

Рис. 4. Локализация p53 (иммунофлуоресценция анти-p53 P5813, Sigma-Aldrich) в интактных (Инт) механорецепторных нейронах и через 4 и 8 ч после аксотомии, а также эти нейроглиальные препараты в проходящем свете и окрашенные Hoechst 33342, селективно флуорохромирующим клеточные ядра в синий цвет. Условные обозначения: А – аксон, звездочки – ядра глиальных клеток, большие белые стрелки – ядра нейронов, маленькая стрелка – ядрышко нейрона, черные стрелки – кариоплазматическое кольцо. Масштабный отрезок 20 мкм.

катехоламинов (L-DOPA декарбоксилазы, тирозин- и триптофангидроксилаз) – на подавление синаптических процессов [50].

Другой объект нашего исследования – аксотомированные ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG) (рис. 2) [7, 45]. Они состоят преимущественно из сенсорных нейронов, получающих информацию от седалищного нерва, иннервирующего задние конечности. После перерезки седалищного нерва нейроны DRG оказываются аксотомированными [44].

Перерезка седалищного нерва (sciatic nerve) на бедре у грызунов – одна из важных экспериментальных моделей нейротравмы. Популярность этой модели связана с доступностью седалищного нерва в средней части бедра животного для хирургического рассечения, а также меньшим неудобством и стрессом животного в сравнении с аксотомией нервов верхних конечностей [44].

В аксотомированных нейронах DRG апоптоз глиальных клеток наблюдался через 24 ч после перерезки седалищного нерва и усиливался на 7-й день, когда апоптоз некоторых нейронов только начинался [7]. Настоящие эксперименты показали, что глиальные клетки, удаленные от места перерезки нерва, были более уязвимы для аксотомии, чем нейроны DRG. Самым ранним проапоптотическим событием в поврежденной DRG была гиперэкспрессия фактора транскрипции E2F1 через 4 ч после перерезки седалищного нерва. Это предшествовало индукции p53 и активации каспазы-3 через 24 ч после аксотомии [7].

E2F1 является одним из важнейших регуляторов апоптоза [7]. Он индуцирует экспрессию ряда генов, регулирующих синтез и репарацию ДНК, клеточный цикл и апоптоз. В свою очередь, его экспрессия контролируется MAP-киназой p38 и фактором транскрипции c-Myc [66–68]. В нашей работе на аксотомированной ВНЦ и спинномозговых ганглиях крыс его уровень после аксотомии повышался уже через 1 и 4 ч, соответственно [69]. Появляется все больше свидетельств того, что факторы транскрипции p53 и E2F1 могут регулировать друг друга посредством взаимодей-

ствия, координируя как пролиферацию, так и гибель клеток и, в конечном итоге, поддерживая гемостаз в живых организмах [70]. При этом ингибирование пути p53/E2F1 предотвращает апоптоз нейронов [69]. Полученные нами данные указывают на возможное регулирование p53 со стороны E2F1 в аксотомированных нейронах DRG [7]. Однако это еще предстоит доказать в ходе будущих экспериментов.

Перерезка седалищного нерва через 24 ч вызывала снижение уровня p53 в ядерной фракции DRG ганглиев крысы и одновременно – повышение уровня p53 в цитоплазматической фракции [7]. Это указывает на перераспределение p53 между клеточными ядрами и цитоплазмой. В цитоплазме p53 непосредственно связывается с митохондриями и инициирует апоптоз [32, 70, 71]. Эти процессы совпадают по времени с усилением апоптоза глиальных клеток, но не нейронов в ганглиях [7].

РОЛЬ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ/ ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ p53 ПРИ АКСОТОМИИ

Ацетилирование p53 вызывает активацию многих генов, контролирующих остановку клеточного цикла и апоптоз [72–74]. p53 может быть ацетилирован с помощью гистонацетилтрансферазы p300/CBP по множественным остаткам лизина в пределах C-концевого регуляторного домена, что сильно коррелирует со стабилизацией и активацией белков [13]. Находящийся в комплексе с p300/CBP белок F также ацетилирует p53 в области сигнала ядерной локализации по лизину K320. Позже было показано, что p53 может *in vivo* ацетилироваться в ответ на множество разнообразных клеточных сигналов стресса. Белки p300/CBP и PCAF ацетилируют p53 по различным сайтам: p300/CBP – по K372, K373, K381 и K382 по C-концам, а PCAF – по K320 в линкерной области, соединяющей ДНК-связывающий и тетрамеризующий домены. Ацетилирование p53 по каждому из этих двух участков приводит к значительному повышению трансактивационной функции p53 [75]. В результате указанных процессов происходит стимуляция инициации транскрипции с p53-респонсивного промотора. Гиперэкспрессия PCAF способствовала регенерации сенсорных аксонов на расстоянии до 1 мм от места поражения в моделях повреждения спинного мозга. Две другие ацетилтрансферазы hMOF и TIP60 учувствуют в ацетилирование p53 по K120 в ДНК-связывающем домене. Интересно, что данная модификация не влияет на стабильность p53 и его способность связывать ДНК, однако ацетилирование p53 вне C-концевого домена имеет решающее значение для активации таких проапоптотических генов как *PUMA* и *BAX* [73].

Фосфорилирование p53, активирующее, как известно, его функции, может облегчать ацетилирование белка. Фосфорилированный p53 более эффективно взаимодействует с HAT (histone acetyltransferase), чем нефосфорилированный. Фосфорилирование p53 по N-концевым остаткам усиливает взаимодействие p53 с p300 [73–75].

Патологические воздействия, такие как нейротравмы, снижают ацетилирование гистонов и негистоновых белков. Вероятно, это происходит в результате активации гистондеацетилаз (HDACs), что нарушает белковый синтез [76–79]. В нашей лаборатории показано, что гистоновые деацетилазы класса I HDAC1, HDAC2 участвуют в регуляции выживаемости и гибели клеток пенумбры после ишемического инсульта в коре мозга крысы [79], а также в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки речного рака и спинномозговых ганглиях крыс [50].

Гистоновые деацетилазы помимо их функции в качестве эпигенетических регуляторов способны деацетилировать и централизованно регулировать активность некоторых факторов транскрипции, а также других белков в цитоплазме клеток [80]. Однако роль эпигенетических процессов, включая процессы деацетилирования негистоновых белков в регуляции гибели и выживаемости клеток после повреждения нервов, пока не изучена [76–80].

Белок p53 является негистоновым белком-мишенью HDAC (рис. 5). HDAC1, HDAC2, HDAC3 и SIRT1, член семейства HDAC класса III, могут действовать как деацетилазы p53 (рис. 5) [80].

В нейронах деацетилирование p53, по-видимому, имеет решающее значение для экспрессии проапоптотических генов, в частности каспаз. HDAC1 и HDAC2 активируют p53 путем деацетилирования его остатков K381 и K382, что приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в апоптозе, включая *Bbc3* (*PUMA*) и *Bim*. HDAC2 может выполнять дополнительную функцию по подавлению других генов-мишеней p53, таких как *p21*. В этом механизме HDAC2 действует с FOXO3a, который рекрутирует HDAC2 на сайт промотора *p21* (рис. 5) [32, 35, 36].

Нами было показано, что перерезка седалищного нерва в первые 24 ч после аксотомии вызывает транслокацию HDAC1 из ядра в цитоплазму, где она может, по всей видимости, деацетилировать различные негистоновые белки, в том числе белок p53, гиперэкспрессия которого также наблюдалась в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG крысы [24]. Деацетилирование p53 может привести к изменению его субклеточной локализации и, как следствие, его активности. Именно поэтому HDAC стали многообещающими мишенями для терапевтических вмеша-

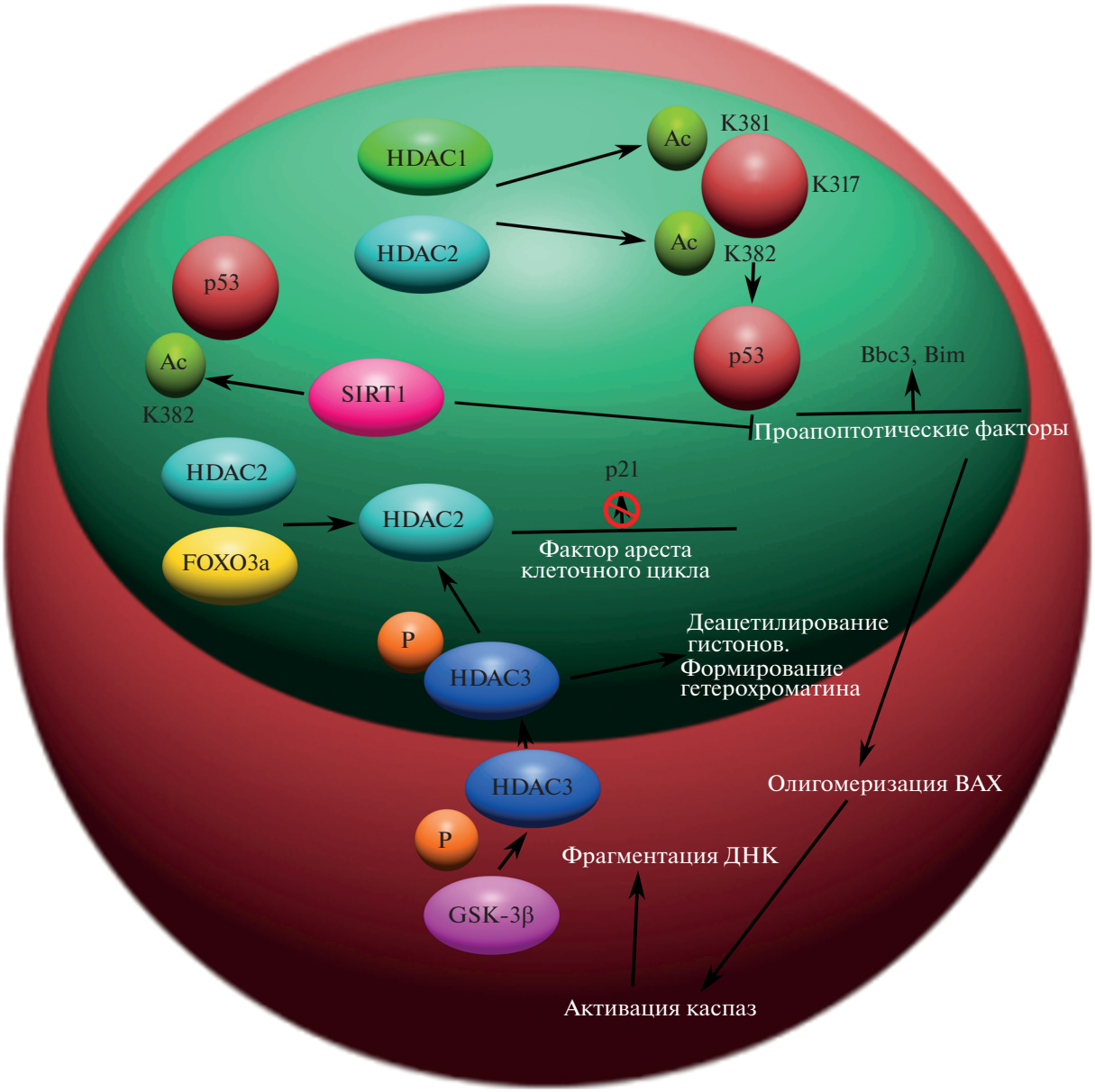

Рис. 5. Эффекты деацетилирования p53 с участием HDAC1, HDAC2, HDAC3 и SIRT1. Ac – ацильная группа; P – остаток фосфорной кислоты.

тельств при патологических состояниях, включая нейродегенеративные патологии [80].

HDAC3, наряду с HDAC1 и HDAC2, играет первостепенную роль в деацетилировании гистонов и образовании гетерохроматина [81]. Гистон-деацетилаза HDAC3 в нейронах локализована главным образом в цитоплазме и активируется путем фосфорилирования серин/треонин киназы GSK-3β: механизм, который обычно ингибируется стимуляцией факторами роста сигнального пути PI3K/Akt. Ряд исследований показывают ключевую нейротоксическую роль HDAC3 [9, 35, 37], однако специфичность активации HDAC3 при индукции гибели нейронов и влияние HDAC3 на уровень апоптоза и экспрессию p53 после аксотомии до конца не изучены [81].

Ряд работ демонстрирует защитный эффект ингибиторов HDAC на различных экспериментальных моделях повреждения нервов [80]. В нашей модели перерезки седалищного нерва было показано, что вальпроат натрия, неспецифический ингибитор HDAC I класса, защищает клетки DRG крысы от апоптоза и практически полностью отменяет вызванные аксотомией изменения экспрессии и субклеточной локализации p53. Вероятно, защитный эффект вальпроата натрия связан с регуляцией экспрессии и внутриклеточ-

ной локализации p53 путем подавления деацетилирования p53 с помощью HDAC1 [49].

Таким образом, стратегии, направленные на усиление ацетилирования p53 по лизинам K381 и K382, могут способствовать разработке соединений, которые будут проявлять нейропротекторные эффекты в периферической нервной системе при нейротравмах [35, 36, 73].

В отличие от HDAC I класса, которые продемонстрировали нейротоксический эффект в аксотомированных нейронах [80, 81], сиртуин 1 (SIRT1), член семейства никотинамидаденозиндинуклеотид-зависимых деацетилаз, ингибирует транскрипцию p53, деацетилируя его по лизину K382 на C-конце. Сиртуины выполняют различные функции в центральной нервной системе [80, 82–86]. Доказательства положительного воздействия SIRT1, полученные на моделях животных и исследованиях на людях, предполагают, что активация SIRT1 может быть потенциальным терапевтическим средством лечения нейродегенеративных заболеваний [82–86]. Однако в ряде работ на моделях нейродегенеративных заболеваний на животных также были сообщения о том, что активация SIRT1 не оказывает нейропротекторного действия [86]. Эти противоречивые результаты могут быть вызваны различными факторами. Кроме того, не изучена роль SIRT1 в повреждениях периферических нервов, что тоже будет интересно, учитывая возможное влияние этого белка на активность p53. Подавление p53 путем активации SIRT1 может быть потенциальной терапевтической стратегией при лечении заболеваний, связанных с повреждением нервов [82–86].

Приведенные нами данные подтверждают важность дальнейшего исследования механизмов регуляции белка p53 с участием HDACs в процессах нейродегенерации и нейропротекции. Использования низкомолекулярных ингибиторов активности HDAC в качестве терапевтических инструментов для защиты нейронов при повреждениях также предстоит изучить в дальнейшем.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таким образом, гиперэкспрессия белка p53, описанная в ряде модельных объектов повреждения периферических нервов [6, 8–12, 27], указывает на ключевую роль этого белка в регуляции жизнеспособности нейронов после нейротравмы. Накопленные данные свидетельствуют о том, что механизмы, регулирующие активность p53, и механизмы, с помощью которых p53 влияет на выживание и гибель нейронов, являются сложными и контролируются множеством сигнальных путей [87]. Сложная система регуляции активности p53 создает трудности для определения места и роли этого белка в патогенезе нейротравмы [7, 38]. По-видимому, судьба поврежденных нервных клеток определяется балансом между различными модальностями активности p53 [6].

Неясно, как перерезка аксона вызывает апоптоз глиальных клеток, удаленных на несколько миллиметров от места перерезки. Какие молекулы служат проапоптотическими сигналами нейроглии, и как они стимулируют p53, регулирующего гибель этих клеток? Можно предположить участие Ca^{2+} или NO в качестве низкомолекулярных мессенджеров в глиальном апоптозе. Сразу после аксотомии Ca^{2+} может проникать в поврежденные глиальные клетки в месте пересечения и распространяться по глиальному синцитию. Ca^{2+} способен актировать нейрональную NO-синтазу, которая продуцирует NO, а он в свою очередь легко переносится между клетками и вызывает их апоптоз. Альтернативно, NO может проникать в разрезанный аксон и индуцировать ретроградные сигнальные каскады, которые переносят некоторые проапоптотические молекулы в глиальные клетки. Известно, что в астроцитах NO индуцирует p53-опосредованную транслокацию Bax в митохондрии, которая вызывает апоптоз. Дальнейшие исследования должны проверить эти гипотезы [1, 6].

Открытым остается вопрос об эпигенетической регуляции p53 в нервных клетках при аксотомии [76, 80]. Не изучено влияние аксотомии на субклеточную локализацию p53. Это имеет важное значение, поскольку при действии патологических факторах HDACs I класса могут перемещаться из ядра в цитоплазму и ацетилировать там различные цитоплазматические белки, включая транскрипционный фактор p53 [80]. Деацетилирование p53 способствует изменению его субклеточной локализации, как следствие этого, его активности. Это и предстоит изучить в дальнейшей работе.

Полученные знания лягут в основу теоретической базы, что поможет лучше понять фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов. Белок p53 можно рассматривать как многообещающую молекулярную мишень для разработки потенциальных нейропротективных агентов, а его ингибирование является важной терапевтической стратегией, направленной на защиту и повышение выживаемости нейронов при нейротравмах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028 и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

Соблюдение этических норм. Для данной статьи авторами не проводились эксперименты с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berezhnaya E., Bibov M., Komandirov M., Neginskaya M., Rudkovskii M., Uzdensky A. 2017. Involvement of MAPK, Akt/GSK-3β and AMPK/mTOR signaling pathways in protection of remote glial cells from axotomy-induced necrosis and apoptosis in the isolated crayfish stretch receptor. *Mol. Cell. Neurosci*. **83**, 1–5.
2. Rishal I., Fainzilber M. 2014. Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci*. **15**, 32–42.
3. Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog. Neurobiol*. **82**, 163–201.
4. Demir Ö., Barros E., Offutt T., Rosenfeld M., Amaro R. 2021. An integrated view of p53 dynamics, function, and reactivation. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **67**, 187–194.
5. Talebi M., Talebi M., Kakouri E., Farkhondeh T., Pourbagher-Shahri A., Tarantilis P., Samarghandian S. 2021. Tantalizing role of p53 molecular pathways and its coherent medications in neurodegenerative diseases. *Int. J. Biol. Macromol*. **172**, 93–103.
6. Rodkin S., Khaitin A., Pitinova M., Dzreyan V., Guzenko V., Rudkovskii M., Sharifulina S., Uzdensky A. 2020. The localization of p53 in the crayfish mechanoreceptor neurons and its role in axotomy-induced death of satellite glial cells remote from the axon transection site. *J. Mol. Neurosci*. **70**, 532–541.
7. Dzreyan V., Rodkin S., Nikul V., Pitinova M., Uzdensky A. 2021. The expression of E2F1, p53, and caspase 3 in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *J. Mol. Neurosci*. **71**, 826–835.
8. Patel N., Joseph C., Corcoran G., Ray S. 2010. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **245**, 143–152.
9. Akhter R., Sanphui P., Biswas S. 2014. The essential role of p53-up-regulated modulator of apoptosis (Puma) and its regulation by FoxO3a transcription factor in β-amyloid-induced neuron death. *J. Biol. Chem*. **289**, 10812–10822.
10. Checler F., Alves da Costa C. 2014. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. *Pharmacol. Ther*. **142**, 99–113.
11. Culmsee C., Mattson M. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Communs*. **331**, 761–777.
12. Wan C., Ma X., Shi S., Zhao J., Nie X., Han J., Xiao J., Wang X., Jiang S., Jiang J. 2014. Pivotal roles of p53 transcription-dependent and -independent pathways in manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **281**, 294–302.
13. Chumakov P. 2007. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc.)*. **72**, 1399–1421.
14. Fadda E., Nixon M. 2017. The transient manifold structure of the p53 extreme C-terminal domain: Insight into disorder, recognition, and binding promiscuity by molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys*. **19**, 21287–21296.
15. Lee H., Mok K., Muhandiram R., Park K., Suk J., Kim D., Chang J., Sung Y., Choi K., Han K. 2000. Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J. Biol. Chem*. **275**, 29426–29432.
16. Lee C., Martinez-Yamout M., Dyson H., Wright P. 2010. Structure of the p53 transactivation domain in complex with the nuclear receptor coactivator binding domain of CREB binding protein. *Biochemistry*. **49**, 9964–9971.
17. Chène P. 2001. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. **20**, 2611–2617.
18. Wawryk-Gawda E., Chylińska-Wrzos P., Lis-Sochocka M., Chłapek K., Bulak K., Jędrych M., Jodłowska-Jędrych B. 2014. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*. **251**, 525–533.
19. Wang Y., Rosengarth A., Luecke H. 2007. Structure of the human p53 core domain in the absence of DNA. *Acta Crystallogr. D, Biol. Crystallogr*. **63**, 276–281.
20. Brandt T., Kaar J., Fersht A., Veprintsev D. 2012. Stability of p53 homologs. *PLoS One*. **7**, e47889.
21. Khoo K., Mayer S., Fersht A. 2009. Effects of stability on the biological function of p53. *J. Biol. Chem*. **284**, 30974–30980.
22. Raj N., Attardi L. 2017. The transactivation domains of the p53 protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. **7**, a026047.
23. Kannappan R., Mattapally S., Wagle P., Zhang J. 2018. Transactivation domain of p53 regulates DNA repair and integrity in human iPS cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **315**, 512–521.
24. Kumar A., Kumar P., Kumari S., Uversky V., Giri R. 2020. Folding and structural polymorphism of p53 C-terminal domain: One peptide with many conformations. *Arch. Biochem. Biophys*. **684**, 108342.
25. Brooks C., Gu W. 2010. New insights into p53 activation. *Cell Research*. **20**, 614–621.
26. Karakostis K., López I., Peña-Balderas A., Fåhareus R., Olivares-Illana V. 2020. Molecular and biochemical techniques for deciphering p53-MDM2 regulatory mechanisms. *Biomolecules*. **11**, 36.
27. Chao C. 2015. Mechanisms of p53 degradation. *Clin. Chim. Acta*. **438**, 139–147.
28. Sullivan K., Galbraith M., Andrysik Z., Espinosa J. 2018. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*. **25**, 133–143.
29. Liu Y., Tavana O., Gu W. 2019. p53 modifications: Exquisite decorations of the powerful guardian. *J. Mol. Cell Biol*. **11**, 564–577.

30. Simabuco F., Morale M., Pavan I., Morelli A., Silva F., Tamura R. 2018. p53 and metabolism: From mechanism to therapeutics. *Oncotarget*. **9**, 23780–23823.

31. Dai Q., Luo T., Luo S., Wang J., Wang S., Bai Y., Yang Y., Wang Y. 2016. p53 and mitochondrial dysfunction: novel insight of neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **48**. 337–347.

32. Wang D., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R. 2014. p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochim. Biophys. Acta*. **1842**, 1186–1197.

33. Lahalle A., Lacroix M., De Blasio C., Cissé M., Linares L., Le Cam L. 2021. The p53 pathway and metabolism: The tree that hides the forest. *Cancers (Basel)*. **13**, 133.

34. Moxley A., Reisman D. 2021. Context is key: Understanding the regulation, functional control, and activities of the p53 tumour suppressor. *Cell Biochem. Funct.* **39**, 235–247.

35. Schmitt H., Schlamp C., Nickells R. 2016. Role of HDACs in optic nerve damage-induced nuclear atrophy of retinal ganglion cells. *Neurosci. Lett*. **625**, 11–15.

36. Lebrun-Julien F., Suter U. 2015. Combined HDAC1 and HDAC2 depletion promotes retinal ganglion cell survival after injury through reduction of p53 target gene expression. *ASN Neuro*. **7**, 1759091415593066.

37. Bardai F., D'Mello S. 2011. Selective toxicity by HDAC3 in neurons: Regulation by Akt and GSK3beta. *J. Neurosci*. **31**, 1746–1751.

38. Patodia S., Raivich G. 2012. Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. *Front. Mol. Neurosci*. **5**, 8.

39. Dubový P., Klusáková I., Hradilová-Svíženská I., Joukal M. 2018. Expression of regeneration-associated proteins in primary sensory neurons and regenerating axons after nerve injury – an overview. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **301**, 1618–1627.

40. Hill C., Coleman M., Menon D. 2016. Traumatic axonal injury: Mechanisms and translational opportunities. *Trends Neurosci*. **39**, 311–324.

41. Khaitin A., Rudkovskii M., Uzdensky A. 2018. Ca^{2+} mediates axotomy-induced necrosis and apoptosis of satellite glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish mechanoreceptor. *Mol. Cell Neurosci*. **88**, 7–15.

42. McKay Hart A., Brannstrom T., Wiberg M., Terenghi G. 2002. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat Time course of cell death and elimination. *Exp. Brain Res*. **142**, 308–318.

43. Melle C., Ernst G., Grosheva M., Angelov D., Irintchev A., Guntinas-Lichius O., von Eggeling F. 2009. Proteomic analysis of microdissected facial nuclei of the rat following facial nerve injury. *J. Neurosci. Methods*. **185**, 23–28.

44. Savastano L., Laurito S., Fitt M., Rasmussen J., Gonzalez Polo V., Patterson S. 2014. Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J. Neurosci. Meth*. **227**, 166–180.

45. Dzreyan V., Rodkin S., Pitinova M., Uzdensky A. 2021. HDAC1 expression, histone deacetylation, and protective role of sodium valproate in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *Mol. Neurobiol*. **58**, 217–228.

46. Uzdensky A. 2018. Axotomy induces damage to glial cells remote from the transection site in the peripheral nervous system. *Neural. Regen. Res*. **13**, 639–640.

47. Khaitin A., Rudkovskii M., Uzdensky A. 2015. The method of isolation of the crayfish abdominal stretch receptor maintaining a connection of the sensory neuron to the ventral nerve cord ganglion. *Invertebr. Neurosci*. **15**, 176.

48. Uzdensky A., Berezhnaya E., Khaitin A., Kovaleva V., Komandirov M., Neginskaya M., Rudkovskii M., Sharifulina S. 2015. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways. *Mol. Neurobiol*. **52**, 811–825.

49. Casas C., Isus L., Herrando-Grabulosa M., Mancuso F., Borrás E., Sabidó E., Forés J., Aloy P. 2015. Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage. *Sci. Rep*. **5**, 9185.

50. Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A. 2019. Axotomy-induced changes of the protein profile in the crayfish ventral cord ganglia. *J. Mol. Neurosci*. **68**, 667–678.

51. Sun B., Ou H., Ren F., Huan Y., Zhong T., Gao M., Cai H. 2018. Propofol inhibited autophagy through Ca^{2+}/CaMKKβ/AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury. *Mol. Med*. **24**, 58.

52. Shi W., Xu D., Gu J., Xue C., Yang B., Fu L., Song S., Liu D., Zhou W., Lv J., Sun K., Chen M., Mei C. 2018. Saikosaponin-d inhibits proliferation by up-regulating autophagy via the CaMKKβ-AMPK-mTOR pathway in ADPKD cells. *Mol. Cell. Biochem*. **449**, 219–226.

53. Zhou H., Li X., Meinkoth J., Pittman R. 2000. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol*. **151**, 483–494

54. Kakiuchi Y., Yurube T., Kakutani K., Takada T., Ito M., Takeoka Y., Kanda Y., Miyazaki S., Kuroda R., Nishida K. 2019. Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction. *Osteoarthritis Cartilage*. **27**, 965–976

55. Liu Y., Xu H., An M. 2017. mTORC1 regulates apoptosis and cell proliferation in pterygium via targeting autophagy and FGFR3. *Sci. Rep*. **7**, 7339.

56. Hermida M., Dinesh Kumar J., Leslie N. 2017. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv. Biol. Regul*. **65**, 5–15.

57. Beurel E., Jope R. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol*. **79**, 173–189.

58. Al Zaid Siddiquee K., Turkson J. 2008. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res.* **18**, 254–267.

59. Kralova J., Dvorak M., Koc M., Kral V. 2008. p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative. *Oncogene.* **27**, 3010–3020.

60. Sui X., Kong N., Ye L., Han W., Zhou J., Zhang Q., He C., Pan H. 2014. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* **344**, 174–179

61. Buitrago C., Ronda A., de Boland A., Boland R. 2006. MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1alpha, 25(OH)2-vitamin D3 in the C2C12 muscle cell line. *J. Cell. Biochem*. **97**, 698–708.

62. Bishop P., Rocca D., Henley J. 2016. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): Structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J.* **473**, 2453–2462.

63. Chong Z., Lin S., Kang J., Maiese K. 2003. The tyrosine phosphatase SHP2 modulates MAP kinase p38 and caspase 1 and 3 to foster neuronal survival. *Cell. Mol. Neurobiol.* **23**, 561–578.

64. Bassi R., Heads R., Marber M., Clark J. 2008. Targeting p38-MAPK in the ischaemicheart: Kill or cure? *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**,141–146.

65. Yang L., Greig N., Tweedie D., Jung Y., Chiang Y., Hoffer B., Miller J., Chang K., Wang J. 2020. The p53 inactivators pifithrin-μ and pifithrin-α mitigate TBI-induced neuronal damage through regulation of oxidative stress, neuroinflammation, autophagy and mitophagy. *Exp. Neurol.* **324**, 113135

66. Polager S., Ginsberg D. 2009. p53 and E2f: Partners in life and death. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 738–748.

67. Shafiei-Roudbari S., Malekinejad H., Janbaz-Aciabar H., Razi M. 2017. Crosstalk between E2F1 and P53 transcription factors in doxorubicin-induced DNA damage: Evidence for preventive/protective effects of silymarin. *J. Pharm. Pharmacol.* **69**, 1116–1124.

68. Liu Y., Zacksenhaus E. 2000. E2F1 mediates ectopic proliferation and stage-specific p53-dependent apoptosis but not aberrant differentiation in the ocular lens of Rb deficient fetuses. *Oncogene*. **19**, 6065–6073.

69. Ma L., Yu H., Gan S., Gong R., Mou K., Xue J., Sun S. 2017. p53-Mediated oligodendrocyte apoptosis initiates demyelination after compressed spinal cord injury by enhancing ER-mitochondria interaction and E2F1 expression. *Neurosci. Lett.* **644**, 55–61.

70. Fouad S., Hauton D., D'Angiolella V. 2021. E2F1: Cause and consequence of DNA replication stress. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 599332.

71. Kuusk A., Boyd H., Chen H., Ottmann C. 2020. Small-molecule modulation of p53 protein-protein interactions. *Biol. Chem*. **401**, 921–931.

72. Brochier C., Dennis G., Rivieccio M., McLaughlin K., Coppola G., Ratan R., Langley B. Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* **33**, 8621–8632.

73. Brooks C., Gu W. 2011. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell.* **2**, 456–462.

74. Marcel V., Nguyen Van Long F., Diaz J. 2018. 40 years of research put p53 in translation. *Cancers (Basel).* **10**, 152.

75. Kruse J., Gu W. 2008. SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell.* **133**, 930–930.e1.

76. Saha A., Tiwari S., Dharmarajan S., Otteson D., Belecky-Adams T. 2018. Class I histone deacetylases in retinal progenitors and differentiating ganglion cells. *Gene Expr. Patterns*. **30**, 37–48.

77. Baltan S., Bachleda A., Morrison R., Murphy S. Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia. 2011. *Transl. Stroke Res.* **2**, 411–423.

78. Chen Y., Zang X., Pan J., Zhu X., Chen F., Chen Z., Xu Y. 2012. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39**, 751–758.

79. Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A. 2020. Expression of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 and their role in apoptosis in the penumbra induced by photothrombotic stroke. *Mol. Neurobiol.* **57**, 226–238.

80. Thomas E., D'Mello S. 2018. Complex neuroprotective and neurotoxic effects of histone deacetylases. *J. Neurochem*. **145**, 96–110.

81. Schmitt H., Pelzel H., Schlamp C., Nickells R. 2014. Histone deacetylase 3 (HDAC3) plays an important role in retinal ganglion cell death after acute optic nerve injury. *Mol. Neurodegener*. **9**, 39.

82. Chen C., Zhou M., Ge Y., Wang X. 2020. SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mech. Ageing. Dev.* **187**, 111215.

83. Gomes B., Silva J., Romeiro C., Dos Santos S., Rodrigues C., Gonçalves P., Sakai J., Mendes P., Varela E., Monteiro M. 2018. Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: Role of SIRT1. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2018**, 8152373.

84. Fujita Y., Yamashita T. 2018. Sirtuins in neuroendocrine regulation and neurological diseases. *Front. Neurosci.* **12**, 778.

85. Yang X., Si P., Qin H., Yin L., Yan L., Zhang C. 2017. The neuroprotective effects of SIRT1 on NMDA-induced excitotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2017**, 2823454.

86. Zhao X., Liu Y., Zhu G., Liang Y., Liu B., Wu Y., Han M., Sun W., Han Y., Chen G., Jiang J. 2019. SIRT1 downregulation mediated Manganese-induced neuronal apoptosis through activation of FOXO3a-Bim/PUMA axis. *Sci. Total Environ*. **646**, 1047–1055.

87. Culmsee C., Mark P. Mattson. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **331**, 761–777.

Role of p53-dependent Signal Pathways in Survival and Death of Neurons and Glial Cells in Damage of the Peripheral Nervous System

S. V. Rodkin[1, *], V. A. Dzreyan[1], S. V. Demyanenko[1], A. B. Uzdensky[1]

[1]*Laboratory of Molecular Neurobiology, Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

**e-mail: rodkin_stas@mail.ru*

Neurotrauma is among the main causes of human disability and mortality. However, the mechanisms that mediate the survival and death of cells in the peripheral nervous system are still not fully understood. The p53 protein, known as a tumor suppressor, is the master regulator of basic cellular functions, including DNA repair, cell cycle, metabolism, and apoptosis. Overexpression of p53, shown in a number of experimental models of peripheral nerve injury, suggests an important role of this protein in the pathogenesis of neurotrauma. This review discusses the signaling and epigenetic mechanisms of p53 activation and regulation, which may contribute to the survival or death of neurons and glial cells after traumatic injury. Prospects for further studies of the mechanisms of regulation of the p53 protein, including those involving histone deacetylases, for the development of neuroprotectors are considered.

Keywords: axotomy, neuron, glial cells, apoptosis, p53

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 418–426

УДК 577.23

УЧАСТИЕ ПЕРЕНОСЧИКА ФОСФАТА В ИОНОФОРНОМ РАЗОБЩАЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ω-ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

© 2021 г.
М. В. Дубинин[a], *, А. А. Семенова[a], О. Э. Краснощекова[a], В. Н. Самарцев[a]

[a] *Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000 Россия*

**e-mail: dubinin1989@gmail.com*

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.
После доработки 13.05.2021 г.
Принята к публикации 14.05.2021 г.

В работе исследовано разобщающее влияние ω-гидроксипальмитиновой кислоты (ГПК) на митохондрии печени, энергизованные путем окисления сукцината. Показано, что ГПК более эффективно стимулирует дыхание органелл при условии их инкубации в среде, содержащей хлорид калия, что свидетельствует о способности ГПК оказывать ионофорное влияние на митохондрии, связанное с транспортом ионов калия и/или трис$^+$ в матрикс органелл. Предположено, что в ионофорном действии ГПК может быть задействован переносчик фосфата внутренней мембраны митохондрий. Показано, что субстрат переносчика фосфата – неорганический фосфат (P_i), оказывает существенное ингибирующее влияние на ГПК-индуцированную стимуляцию дыхания митохондрий печени. Кроме того, P_i подавляет ГПК-индуцированное набухание органелл, обусловленное транспортом ионов калия и/или трис$^+$ в матрикс органелл, а также снижает эффективность ГПК как индуктора падения трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий печени. Аналогичное влияние оказывают и ингибиторы переносчика фосфата – N-этилмалеимид (NEM) и иминоди(метилен)фосфонат (ИДМФ). Показано, что при стимуляции дыхания митохондрий 30 мкМ ГПК ресопрягающие эффекты P_i, NEM и ИДМФ составляют соответственно 71 ± 8.3%, 56 ± 6.1% и 34 ± 2.7%. При этом отмечено, что указанные лиганды фосфатного переносчика не влияют на протонофорную активность ГПК. Таким образом, сделан вывод о том, что переносчик фосфата митохондрий принимает участие в ионофорном действии ГПК, предположительно способствуя переносу аниона ГПК с внутреннего монослоя внутренней мембраны на ее наружный монослой.

Ключевые слова: митохондрии печени, разобщение, ионофор, переносчик фосфата, ω-гидроксипальмитиновая кислота

DOI: 10.31857/S0233475521060037

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что свободные монокарбоновые жирные кислоты обладают способностью переносить протоны и различные моновалентные катионы через искусственные и биологические мембраны, как предполагается, в виде комплекса аниона жирной кислоты и протона (или катиона) [1–7]. Ионы кальция или магния препятствуют быстрому перемещению молекулы жирной кислоты с одного монослоя фосфолипидной мембраны на другой и тем самым нарушают способность жирных кислот к быстрому трансмембранному переносу протонов и моновалентных катионов [1, 4].

Способность свободных жирных кислот переносить протоны через внутреннюю мембрану митохондрий связывают с “мягким” разобщением окислительного фосфорилирования, имеющим большое физиологическое значение [8, 9]. В митохондриях печени в разобщающем действии монокарбоновых жирных кислот и, в частности, пальмитиновой принимают участие белки-переносчики внутренней мембраны, осуществляющие обменный транспорт ADP на ATP (ADP/ATP-антипортер) и аспартата на глутамат (аспартат/глутаматный антипортер) [8, 10–12]. Согласно гипотезе В.П. Скулачева, эти белки содействуют переносу аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный, где эти анионы протонируются и перемещаются в обратном направлении без участия белков по механизму флип-флоп, освобождая затем протон в матрикс [8]. Специфический ингибитор ADP/ATP-антипортера карбоксиатрактилат и субстраты аспартат/глутаматного антипортера глутамат и аспартат в митохондриях печени подавляют разобщающее

действие жирных кислот (ресопрягающий эффект) [10, 11].

Участием ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров обусловлено около 70–80% разобщающей активности пальмитиновой и других насыщенных жирных кислот [11, 13]. Другая часть разобщающей активности этих жирных кислот (20–30%) подавляется циклоспорином А в необычной для него высокой концентрации 10 мкМ и, по-видимому, осуществляется путем переключения цитохром-bc_1-комплекса дыхательной цепи на холостой режим работы в отсутствие синтеза ATP [13, 14].

В отличие от протонофорного разобщения ионофорная активность монокарбоновых жирных кислот в энергизованных митохондриях печени существенно усиливается при повышении pH и сопровождается набуханием органелл [5, 6, 15]. Было предположено, что подобное ионофорное разобщающее действие пальмитиновой кислоты обусловлено циклическим транспортом этой жирной кислоты: из межмембранного пространства в матрикс в виде нейтрального комплекса аниона с катионами K^+ и трис$^+$ и в обратном направлении в виде свободного аниона при содействии ADP/ATP-антипортера [15].

Одним из путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их ω-окисление, происходящее, главным образом, в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих ω-гидроксикарбоновых и α,ω-дикарбоновых кислот [16–18]. Так, в процессе ω-окисления пальмитиновой кислоты образуется ω-гидроксипальмитиновая кислота (ГПК). Путь ω-окисления значительно усиливается при некоторых патологических состояниях, сопровождающихся увеличением содержания свободных монокарбоновых жирных кислот и, в частности, при такой распространенной болезни, как диабет [16, 18, 19]. При этих условиях в крови и клетках пациентов наблюдается накопление продуктов ω-окисления жирных кислот [16, 18, 19]. В клетках печени α,ω-дикарбоновые кислоты подвергаются β-окислению главным образом в пероксисомах, в результате чего образуются короткоцепочечные дикарбоновые кислоты и в конечном итоге сукцинат, эффективно окисляющийся митохондриями [19–21]. Путь ω-окисления жирных кислот рассматривается как один из “путей спасения” (rescue pathway) при различных нарушениях метаболизма, связанных с избыточным накоплением свободных жирных кислот [16, 18].

Молекула ГПК отличается от молекулы пальмитиновой кислоты только наличием гидроксильной группы на конце ацильной цепи – в ω-положении. Известно, что нейтральные молекулы ГПК и пальмитиновой кислоты, но не их анионы, способны перемещаться через фосфолипидную бислойную мембрану по механизму флип-флоп [22]. Однако в отличие от пальмитиновой кислоты, стимуляция дыхания ГПК в митохондриях печени помимо протонофорного действия в существенной степени связана с переносом ионов калия и трис$^+$ в матрикс этих органелл [11]. Можно было бы предположить, что такое ионофорное разобщающее действие ГПК обусловлено циклическим транспортом этой жирной кислоты: из межмембранного пространства в матрикс в виде нейтрального комплекса аниона с катионами калия и трис и в обратном направлении в виде свободного аниона при содействии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров. Однако ни карбоксиатрактилат, ни глутамат не оказывали влияния на стимуляцию дыхания ГПК [11]. Следовательно, транспорт аниона ГПК из матрикса в межмембранное пространство осуществляется при содействии какого-либо другого белка.

Наше внимание привлек переносчик фосфата – интегральный белок внутренней мембраны митохондрий, который в процессе окислительного фосфорилирования осуществляет перенос аниона неорганического фосфата из межмембранного пространства в матрикс [9, 23, 24]. Известно, что в митохондриях фосфатный переносчик наряду с ATP-синтазой и ADP/ATP-антипортером участвует в формировании комплекса ATP-синтасомы, что способствует повышению общей эффективности окислительного фосфорилирования [23, 24]. Кроме того, в опытах на реконструированной системе со встроенным в липосомы переносчиком фосфата показана способность этого белка ускорять трансмембранный перенос протонов свободными монокарбоновыми жирными кислотами [25, 26]. В митохондриях печени переносчик фосфата, по-видимому, участвует в разобщающем действии подобных жирных кислот только совместно с ADP/ATP- и аспартат/глутаматным антипортерами, выполняя при этом лишь вспомогательную роль [27].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий печени крыс. Митохондрии из печени белых половозрелых крыс самцов (весом 210–250 г) выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) фракции V в соответствии с описанной ранее методикой [28]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали раствор БСА. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (60–

70 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания митохондрий печени крыс. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания). Способность P_i, NEM и ИДМФ ингибировать стимулированное ГПК дыхание (ресопрягающий эффект) выражали в процентах и определяли как отношение величины ингибирования дыхания в присутствии жирной кислоты одним из этих ресопрягающих агентов к величине стимуляции дыхания этой жирной кислотой по формуле: $100 \times \Delta J_u/(J_u - J_4)$, где J_u и J_4 – скорости дыхания (мкмоль O_2/мин на 1 мг белка) соответственно в присутствии и в отсутствие ГПК, ΔJ_u – снижение скорости дыхания указанными агентами.

Оценка разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония ($ТФФ^+$) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью $ТФФ^+$-чувствительного электрода и многоканальной электрометрической системы Record 4usb в кювете объемом 1.2 мл при 25°C при постоянной аэрации и перемешивании.

В большинстве экспериментов применяли среду инкубации, содержащую 130 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS (pH до 7.4 доводили трис). В некоторых экспериментах была использована сахарозная среда инкубации: 250 мМ сахарозы вместо KCl.

Оценка ионофорной и протонофорной активности ГПК. Ионофорную активность ГПК оценивали по интенсивности энергозависимого набухания митохондрий путем изменения оптической плотности суспензии митохондрий (*A*) при длине волны 540 нм на спектрометре Ocean Optics FLAME-T-UV-VIS (Ocean Optics Inc., США) при постоянном перемешивании и при температуре 25°C. Протонофорную активность ГПК оценивали по интенсивности набухания деэнергизованных (недышащих) митохондрий, инкубируемых в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина [5, 29]. Набухание митохондрий регистрировали путем изменения оптической плотности суспензии митохондрий (*A*) при длине волны 600 нм на спектрофотометре Ocean Optics FLAME-T-UV-VIS (Ocean Optics Inc.) в ячейке объемом 1 мл при постоянном перемешивании и температуре 25°C. В этом случае применяли среду инкубации, содержащую 145 мМ ацетата калия, 5 мМ трис, 0.2 мМ EDTA, 0.5 мкМ валиномицина и 1 мкМ ротенона (pH 7.4).

При проведении экспериментов в ячейку или в кювету сразу после митохондрий во всех случаях добавляли ротенон (1 мкМ) и, если это необходимо, $ТФФ^+$ (1 мкМ). Все другие добавки осуществляли, как указано в таблице и на рисунках. В контрольных пробах к митохондриям добавляли растворители в том же объеме, как в добавках с исследуемыми веществами. Во всех случаях растворители не оказывали существенного влияния на исследуемые параметры митохондрий.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prizm 5 и Microsoft Excel и представлены как среднее ± стандартная ошибка средней (n = 3–4). Полученные данные были обработаны статистически с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для оценки значимости различий использовался уровень вероятности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании ионофорного действия ГПК прежде всего необходимо выяснить особенности стимуляции дыхания митохондрий этой жирной кислотой при замене сахарозной среды инкубации KCl-средой, не содержащей сахарозу. Как видно из рис. 1, ГПК вплоть до ее концентрации 45 мкМ более эффективно стимулирует дыхание митохондрий печени при условии их инкубации в KCl-среде, чем в сахарозной среде. Следовательно, в KCl-среде инкубации активность ГПК как индуктора свободного дыхания может быть обусловлена энергозависимым транспортом ионов в матрикс (ионофорное действие). По этой причине во всех следующих опытах была использована KCl-среда инкубации.

В следующих экспериментах было исследовано влияние лигандов переносчика фосфата – его субстрата неорганического фосфата (P_i), а также ингибиторов: N-этилмалеимида (NEM) [30, 31] и иминоди(метилен)фосфоната (ИДМФ) [25, 26] на стимуляцию дыхания митохондрий печени ГПК. Как известно, переносчик фосфата при физиологических условиях, т.е. в процессе синтеза ATP, осуществляет транспорт неорганического фосфата (P_i) совместно с H^+ (или в обмен на OH^-) [9, 23]. В том случае, если синтез ATP не происходит, переносчик фосфата катализирует электронейтральный P_i/P_i-обмен [30, 32]. Следует отметить, что K_m переносчика фосфата митохондрий печени (B изоформа) для P_i составляет 0.78 мМ [32]. Следовательно, применяемая нами концентрация P_i 2 мМ существенно больше этой величины. Как видно из таблицы, наличие в среде инкубации P_i в указанной концентрации приводит к небольшой стимуляции дыхания в состоянии 4. Это может быть связано с частичным транспортом P_i совместно с H^+, что проявляется как слабое

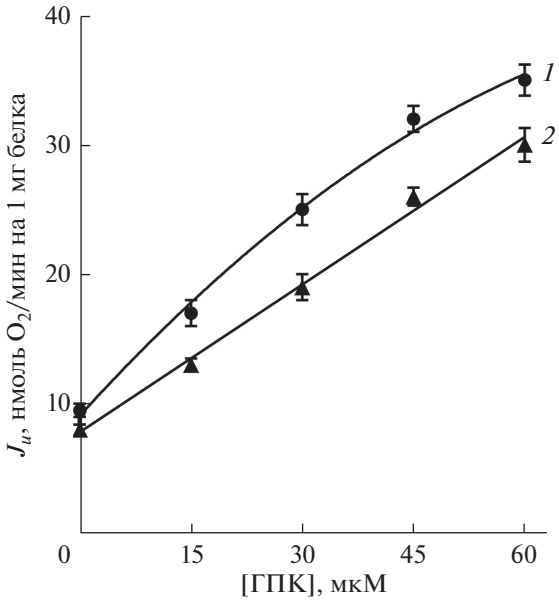

Рис. 1. Влияние ГПК на дыхание митохондрий печени, инкубируемых в KCl- (*1*) и сахарозной (*2*) средах инкубации. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". Концентрация митохондриального белка – 1.2 мг/мл. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

разобщающее действие P_i. При этом P_i эффективно ингибирует дыхание митохондрий, стимулированное ГПК в концентрации от 15 до 60 мкМ (табл. 1). Вместе с тем P_i не оказывает влияния на дыхание митохондрий в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола (ДНФ) в концентрации 50 мкМ необходимой для проявления максимального разобщающего действия (табл. 1). Следовательно, P_i не оказывает ингибирующего влияния на транспорт электронов по дыхательной цепи. NEM в количестве 170 нмоль на 1 мг белка митохондрий полностью ингибирует транспорт P_i в митохондриях печени, по-видимому, взаимодействуя с SH-группой цистеина-41 [30, 31]. Как видно из таблицы, NEM в концентрации 240 мкМ (200 нмоль на 1 мг белка митохондрий) не влияет на дыхание митохондрий в состоянии 4, но эффективно ингибирует (на 35–40%) дыхание в присутствии ГПК. В то же время NEM в указанной концентрации не оказывает влияния на полностью разобщенное ДНФ дыхание (табл. 1).

Известно, что при ингибировании транспорта P_i в митохондриях печени K_i для ИДМФ составляет 5.2 мМ [26]. Следовательно, для проявления полного ингибирующего действия концентрация ИДМФ должна составлять как минимум 15 мМ. Однако в наших экспериментах уже в концентрации 10 мМ ИДМФ более чем на 40% снижает скорость полностью разобщенного ДНФ дыхания, что свидетельствует об ингибировании транспорта электронов по дыхательной цепи (данные не приведены). Как видно из таблицы, в концентрации 5 мМ ИДМФ не влияет на дыхание митохондрий в состоянии 4, но частично на 20% ингибирует дыхание в присутствии ГПК в концентрации от 30 до 60 мкМ. При этом в указанной концентрации ИДМФ также не влияет на разобщенное ДНФ дыхание (табл. 1).

Эффективность действия ГПК как индуктора свободного дыхания в митохондриях может быть выражена количественно как величина стимуляции дыхания в состоянии 4 (ΔJ_4). Это позволяет сравнить эффективность действия указанных лигандов переносчика фосфата как ингибиторов

Таблица 1. Влияние P_i, NEM и ИДМФ на дыхание митохондрий печени в состоянии 4 и в присутствии ГПК в различной концентрации

ГПК, мкМ	Скорость дыхания, нмоль O_2/мин на 1 мг белка			
	контроль ($n = 4$)	P_i 2 мМ ($n = 3$)	NEM 240 мкМ ($n = 3$)	ИДМФ 5 мМ ($n = 4$)
0	8.6 ± 0.23	10.1 ± 0.23*	8.9 ± 0.21	9.1 ± 0.11
15	15.3 ± 0.53	11.9 ± 0.57*	11.7 ± 0.52*	12.8 ± 0.29*
30	23.9 ± 1.26	14.6 ± 0.52*	15.6 ± 0.69*	19.2 ± 0.91*
45	30.9 ± 1.31	17.8 ± 0.63*	18.2 ± 1.01*	24.8 ± 0.54*
60	33.3 ± 0.93	21.8 ± 0.41*	19.8 ± 0.72*	26.3 ± 0.78*
60 + ДНФ 50 мкМ	44.6 ± 1.94	46.5 ± 1.44	39.7 ± 1.54	40.7 ± 2.44

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". P_i, NEM и ИДМФ были добавлены в экспериментальную ячейку до внесения ГПК. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего.
* Различия между опытом (присутствие модифицирующих агентов) и контролем (их отсутствие) статистически значимы, $p < 0.05$.

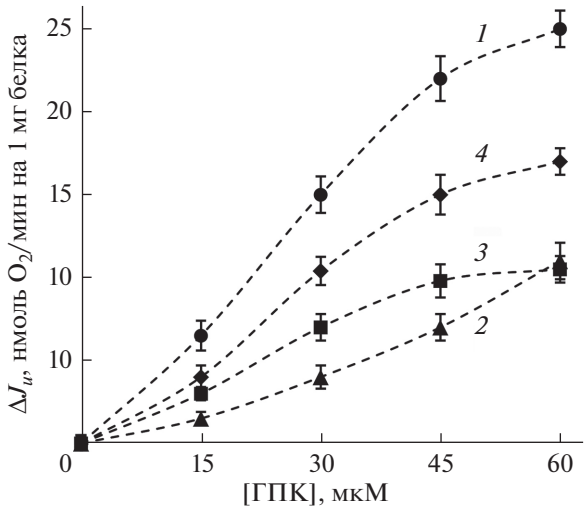

Рис. 2. Зависимость величин стимуляции дыхания митохондрий печени в состоянии 4 (ΔJ_u, нмоль O_2/мин на 1 мг белка) ГПК от концентрации этой жирной кислоты в отсутствие (*1*) и присутствии: 2 мМ P_i (*2*), 240 мкМ NEM (*3*), 5 мМ ИДМФ (*4*). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

стимуляции дыхания ГПК. Как видно из рис. 2, наиболее эффективно действуют P_i и NEM, в то время как ИДМФ менее эффективен.

Ранее для количественной оценки степени ингибирования карбоксиатрактилатом, глутаматом и циклоспорином А стимулированного пальмитиновой кислотой дыхания митохондрий были использованы величины их ресопрягающих эффектов [13, 27]. По аналогии с этими ресопрягающими агентами способность P_i, NEM и ИДМФ ингибировать разобщающее действие жирных кислот также была выражена количественно как ресопрягающий эффект. Так, в отсутствие влияния указанных соединений на действие ГПК их ресопрягающий эффект равен 0, при полном ингибировании – 100%. Проведенные расчеты показали, что при стимуляции дыхания митохондрий 30 мкМ ГПК ресопрягающие эффекты P_i, NEM и ИДМФ составляют соответственно 71 ± ± 8.3% ($n = 3$), 56 ± 6.1% ($n = 3$) и 34 ± 2.7% ($n = 4$).

Выше уже отмечалось, что стимуляция ГПК дыхания митохондрий, инкубируемых в KCl-среде, может быть обусловлена как протонофорным, так и ионофорным действием этой жирной кислоты. Эффективным методом оценки способности различных соединений транспортировать протоны через внутреннюю мембрану митохондрий является регистрация набухания деэнергизованных органелл в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина [5, 29]. Как видно из рис. 3, в этих условиях ГПК в концентрации 30 мкМ индуцирует набухание митохондрий печени, что свидетельствует о протонофорном действии этой жирной кислоты. P_i и NEM не влияют на набухание митохондрий в присутствии ГПК (рис. 3). Полученные результаты позволяют говорить о том, что указанные лиганды переносчика фосфата не влияют на протонофорную активность ГПК. Следовательно, эффективное ингибирование P_i и NEM стимулированного ГПК дыхания митохондрий может быть связано с подавлением ионофорного действия этой жирной кислоты.

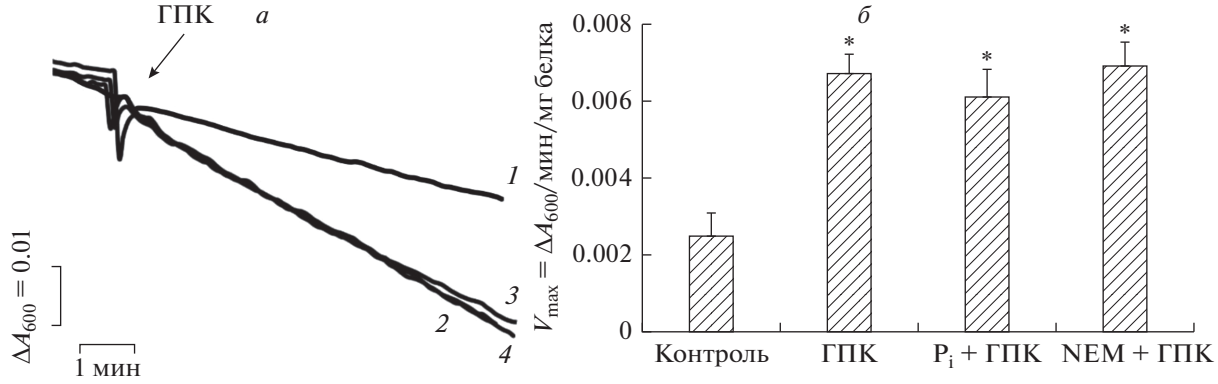

Рис. 3. Кинетика (*а*) и скорость (*б*) набухания митохондрий печени крысы в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина. На панели *а* цифрами обозначены кривые, полученные при добавлении различных агентов: *1* – без добавок; *2* – 30 мкМ ГПК; *3* – 2 мМ P_i + 30 мкМ ГПК; *4* – 200 мкМ NEM + 30 мкМ ГПК. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". Концентрация митохондриального белка в кювете – 1 мг/мл. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. На диаграмме *б* приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 3$). * – различия между контролем (без добавок) и экспериментом (с тестируемыми агентами) статистически значимы, $p < 0.05$.

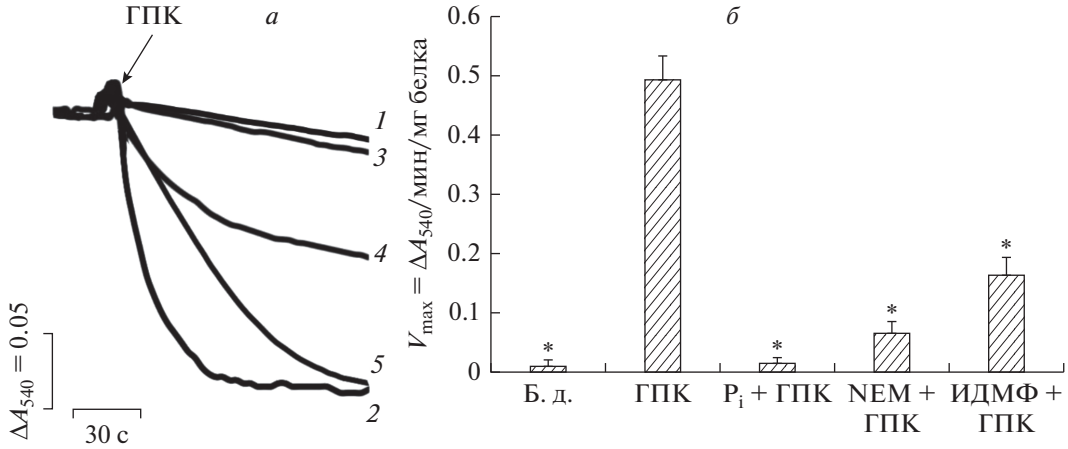

Рис. 4. Кинетика (*а*) и скорость (*б*) набухания митохондрий печени крысы в KCl-среде. На панели *а* цифрами обозначены кривые, полученные при добавлении различных агентов: *1* – без добавок; *2* – 30 мкМ ГПК; *3* – 2 мМ P_i + 30 мкМ ГПК; *4* – 200 мкМ NEM + 30 мкМ ГПК; *5* – 5 мМ ИДМФ + 30 мкМ ГПК. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". Концентрация митохондриального белка в кювете – 1 мг/мл. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. На диаграмме *б* приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 3). * – статистически значимые различия между скоростью ГПК-индуцированного набухания в присутствии различных агентов или в отсутствие добавок (Б.д., $p < 0.05$).

Известно, что транспорт K^+ и других моновалентных катионов в матрикс энергизованных митохондрий сопровождается набуханием этих органелл [5, 6, 33–35]. Как показано на рис. 4, ГПК в концентрации 30 мкМ эффективно индуцирует снижение оптической плотности суспензии митохондрий, что свидетельствует о набухании этих органелл. Такое действие ГПК в значительной степени подавляется 2 мМ P_i (рис. 4, кривая *3*). Аналогичным действием обладают и ингибиторы переносчика фосфата: NEM (рис. 4, кривая *4*) и 5 мМ ИДМФ (рис. 4, кривая *5*). При оценке влияния ГПК на трансмембранный потенциал митохондрий печени, инкубируемых в KCl-среде, получены схожие результаты (рис. 5). Действительно, можно видеть, что 30 мкМ ГПК вызывает частичный выход $ТФФ^+$ из органелл, что свидетельствует о снижении мембранного потенциала митохондрий печени. При этом 2 мМ P_i и менее эффективно 200 мкМ NEM снижают такой эффект ГПК. Стоит отметить, что указанные лиганды фосфатного переносчика не влияют на снижение мембранного потенциала митохондрий, индуцированное 50 мкМ ДНФ (рис. 5).

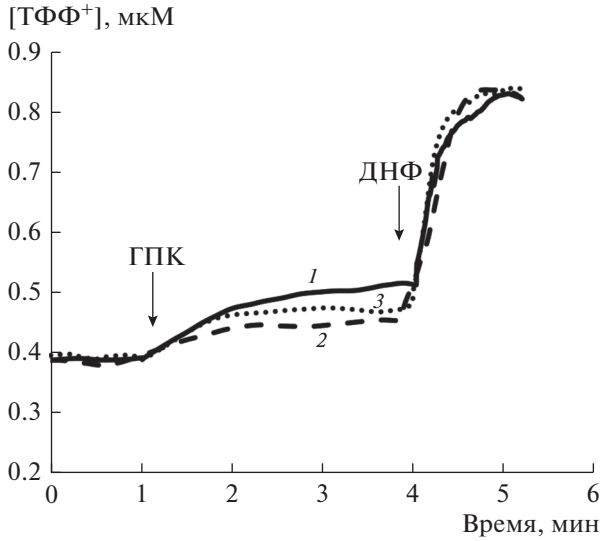

Рис. 5. Влияние ГПК на разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий. Цифрами обозначены кривые, полученные при добавлении различных агентов: *1* – 30 мкМ ГПК, *2* – 2 мМ P_i + 30 мкМ ГПК, *3* – 200 мкМ NEM + 30 мкМ ГПК. Другие добавки: 50 мкМ ДНФ. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе "Материалы и методы". Концентрация митохондриального белка в кювете – 1 мг/мл. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что лиганды переносчика фосфата: его субстрат P_i и ингибиторы – NEM и ИДМФ снижают активность ГПК как индуктора свободного дыхания, связанную с переносом ионов калия в матрикс митохондрий печени (ионофорное действие). Эти данные позволяют говорить о том, что переносчик фосфата в митохондриях печени принимает участие в ионофорном действии ГПК. Как уже отмечалось во введении, нейтральные молекулы ГПК и пальмитиновой кислоты, но не их анионы, способны

перемещаться через фосфолипидную бислойную мембрану по механизму флип-флоп [22]. Ионофорное действие ГПК в энергизованных митохондриях печени может быть обусловлено транспортом этой жирной кислоты из межмембранного пространства в матрикс в виде нейтрального комплекса аниона с катионами K^+ и (или) трис$^+$. В этом случае можно полагать, что фосфатный переносчик способен содействовать переносу аниона ГПК с внутреннего монослоя внутренней мембраны на наружный монослой. Добавление P_i к митохондриям, вероятно, индуцирует конформационные изменения молекулы переносчика, характерные для транспорта аниона P_i совместно с протоном или для электронейтрального P_i/P_i-обмена [30, 32]. Можно полагать, что в этой конформации переносчик фосфата не способен содействовать переносу аниона ГПК с внутреннего монослоя внутренней мембраны на наружный монослой. Связывание NEM с SH-группами цистеина приводит к конформационным изменениям молекулы переносчика, при которых этот транспорт осуществляется с значительно меньшей скоростью. По-видимому, взаимодействие ИДМФ с переносчиком фосфата приводит к аналогичным изменениям транспорта аниона ГПК.

Как уже было сказано во введении, путь ω-окисления значительно усиливается при некоторых патологических состояниях, сопровождающихся увеличением содержания свободных монокарбоновых жирных кислот, и, в частности, при такой распространенной болезни, как диабет [16, 18, 19]. Подобные нарушения липидного и углеводного обменов приводят к увеличению содержания в том числе и ω-гидроксикарбоновых кислот [16, 18, 19], а также к развитию окислительного стресса [34]. Стимуляция свободного дыхания ГПК сопровождается эффективным ингибированием генерации H_2O_2 в изолированных митохондриях печени [11]. Следовательно, индукцию ГПК свободного дыхания в митохондриях печени можно рассматривать как один из “путей спасения” гепатоцитов при различных патологических состояниях, сопровождающихся нарушениями метаболизма углеводов и липидов и усилением окислительного стресса, в том числе и при диабете [36]. Можно полагать, что переносчик фосфата играет существенную роль в действии ГПК как модулятора таких патологических состояний.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-015-00124).

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wojtczak L. 1974. Effect of fatty acids and acyl-CoA on the permeability of mitochondrial membranes to monovalent cations. *FEBS Lett.* **44**, 25–30.
2. Кочергинский Н.М., Осак И.С., Демочкин В.В., Рубайло В.Л. 1987. Физико-химический механизм ионофорной активности жирных кислот, стимулирующих трансмембранный обмен одновалентных катионов. *Биол. мембраны*. **4**, 838–848.
3. Cooper C.E., Wrigglesworth J.M., Nicholls P. 1990. The mechanism of potassium movement across the liposomal membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1008–1012.
4. Sharpe M.A., Cooper C.E., Wrigglesworth J.M. 1994. Transport of K^+ and cations across phospholipid membranes by nonesterified fatty acids. *J. Membr. Biol.* **141**, 21–28.
5. Schönfeld P., Wieckowski M.R., Wojtczak L. 2000. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* **471**, 108–112.
6. Schönfeld P., Gerke S., Bohnensack R., Wojtczak L. 2003. Stimulation potassium cycling in mitochondria by long-chain fatty acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1604**, 125–133.
7. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vyssokikh M.Y., Pustovidko A.V., Markova O.V., Yaguzhinsky L.S., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P. 2010. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 663–668.
8. Skulachev V.P. 1998. Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1363**, 100–124.
9. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. 2010. *Мембранная биоэнергетика*. М.: Изд-во Московского университета. 368 с.
10. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P., Markova O.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. 1997. Involved of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1339**, 251–257.
11. Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова С.И., Дубинин М.В. 2019. ω-Гидроксипальмитиновая и α,ω-гексадекандикарбоновая кислоты как активаторы свободного дыхания и ингибиторы генерации H_2O_2 в митохондриях печени. *Биол. мембраны*. **36**, 428–438.

12. Bertholet A.M., Chouchani E.T., Kazak L., Angelin A., Fedorenko A., Long J.Z., Vidoni S., Garrity R., Cho J., Terada N., Wallace D.C., Spiegelman B.M., Kirichok Y. 2019. H^+ transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Nature*. **7766**, 515–520.

13. Samartsev V.N., Semenova A.A., Dubinin M.V. 2020. A comparative study of the action of protonophore uncouplers and decoupling agents as inducers of free respiration in mitochondria in states 3 and 4: theoretical and experimental approaches. *Cell Biochem. Biophys.* **78**, 203–216.

14. Semenova A.A., Samartsev V.N., Dubinin M.V. 2021. The stimulation of succinate-fueled respiration of rat liver mitochondria in state 4 by α,ω-hexadecanedioic acid without induction of proton conductivity of the inner membrane. Intrinsic uncoupling of the bc_1 complex. *Biochimie*. **181**, 215–225.

15. Самарцев В.Н., Пайдыганов А.П., Полищук Л.С., Зелди И.П. 2004. Изучение разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при различных pH среды инкубации. *Биол. мембраны*. **21**, 39–45.

16. Wanders R.J., Komen J., Kemp S. 2011. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J.* **278**, 182–194.

17. Longo N., Frigeni M., Pasquali M. 2016. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1863**, 2422–2435.

18. Ribel-Madsen A., Ribel-Madsen R., Brøns C., Newgard C.B., Vaag A.A., Hellgren L.I. 2016. Plasma acylcarnitine profiling indicates increased fatty acid oxidation relative to tricarboxylic acid cycle capacity in young, healthy low birth weight men. *Physiol. Rep.* **4**, e12977.

19. Hardwick J.P. 2008. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2263–2275.

20. Tserng K.Y., Jin S.J. 1991. Metabolic conversion of dicarboxylic acids to succinate in rat liver homogenates. A stable isotope tracer study. *J. Biol. Chem.* **266** (5), 2924–2929.

21. Westin M.A., Hunt M.C., Alexson S.E. 2005. The identification of a succinyl-CoA thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **280** (46), 38125–38132.

22. Jezek P., Modriansky M., Garlid K.D. 1997. Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.* **408**, 161–165.

23. Ko Y.H., Delannoy M., Hulliben J., Chiu W., Pedersen P.L. 2003. Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP and carriers for P_i and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* **278**, 12305–12309.

24. Beutner G., Alanzalon R.E., Porter G.A. 2017. Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes. *Sci. Rep.* **7**, 14488.

25. Zachova M., Kramer R., Jezek P. 2000. Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 499–508.

26. Engstová H., Zácková M., Růzicka M., Meinhardt A., Hanus J., Krämer R., Jezek P. 2001. Natural and azido fatty acids inhibit phosphate transport and activate fatty acid anion uniport mediated by the mitochondrial phosphate carrier. *J. Biol. Chem.* **276** (7), 4683–4691.

27. Самарцев В.Н., Кожина О.В., Марчик Е.И., Шамагулова Л.В. 2011. Участие переносчика фосфата в разобщающем действии пальмитиновой кислоты в митохондриях печени в составе комплекса с ADP/ATP- и аспартат/глутаматным антипортерами. *Биол. мембраны*. **28** (3), 206–214.

28. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2018. Membranotropic effects of ω-hydroxypalmitic acid and Ca^{2+} on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50** (5), 391–401.

29. Popova L.B., Nosikova E.S., Kotova E.A., Tarasova E.O., Nazarov P.A., Khailova L.S., Balezina O.P., Antonenko Y.N. 2018. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes.* **1860** (5), 1000–1007.

30. Ligeti E., Brandolin G., Dupont Y., Vignais P.V. 1985. Kinetic of P_i–P_i exchange in rat liver mitochondria. Rapid filtration experiments in the millisecond time range. *Biochemistry.* **24,** 4423–4428.

31. Ferreira G.C., Pedersen P.L. 1993. Phosphate transport in mitochondria: past accomplishments, present problems, and future challenges. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 483–492.

32. Fiermonte G., Dolce V., Palmieri F. 1998. Expression in Escherichia coli, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**, 22782–22787.

33. Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchengers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**, 1127–1155.

34. Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Копылов А.Т. 2007. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. I. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции. *Вестник РАМН*. **2**, 34–43.

35. Szabo I., Zoratti M. 2014. Mitochondrial channels: Ion fluxes and more. *Physiol. Rev.* **94**, 519–608.

36. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Dubinin M.V. 2020. Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca^{2+}-dependent permeability transition pore. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (18), 6559.

The Role of the Phosphate Carrier in the Ionophore Uncoupling Action of ω-Hydroxypalmitic Acid in Liver Mitochondria

M. V. Dubinin[1], *, A. A. Semenova[1], O. E. Krasnoshchekova[1], V. N. Samartsev[1]

[1]*Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia*

**e-mail: dubinin1989@gmail.com*

This paper examines the uncoupling effect of ω-hydroxypalmitic acid (HPA) on liver mitochondria energized by oxidation of succinate. It was shown that HPA more effectively stimulates respiration of mitochondria in the case of incubation in a medium containing potassium chloride, which indicates the ability of HPA to exert an ionophore effect on mitochondria associated with the transport of potassium and/or Tris ions into the matrix of organelles. It was suggested that the phosphate carrier of the inner mitochondrial membrane can be involved in the ionophore action of HPA. We have shown that inorganic phosphate (P_i), a phosphate carrier substrate, has a significant inhibitory effect on HPA-induced stimulation of respiration in liver mitochondria. In addition, P_i inhibits HPA-induced swelling of organelles caused by the transport of potassium and/or Tris ions into the mitochondrial matrix and also reduces the efficiency of HPA as an inducer of a decrease in the transmembrane potential ($\Delta\psi$) of liver mitochondria. The inhibitors of the phosphate carrier, N-ethylmaleimide (NEM) and iminodi(methylene)phosphonate (IDMP), have a similar effect. It was shown that, upon stimulation of mitochondrial respiration by 30 μM HPA, the recoupling effects of P_i, NEM, and IDMP are 71 ± 8.3%, 56 ± 6.1%, and 34 ± 2.7%, respectively. Noteworthy, these ligands of the phosphate carrier have no effect on the protonophore effect of HPA. Thus, we conclude that the phosphate carrier of liver mitochondria takes part in the ionophore action of HPA, possibly facilitating the transfer of the HPA anion from the inner monolayer of the inner membrane to its outer monolayer.

Keywords: liver mitochondria, uncoupling, ionophore, phosphate carrier, ω-hydroxypalmitic acid

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 427–433

УДК 577.352.4

ИНСУЛИН СПОСОБСТВУЕТ НОРМАЛИЗАЦИИ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА И СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ МОЗГА

© 2021 г. И. А. Красильникова[a], *, И. А. Помыткин[b], В. Г. Пинелис[a], А. М. Сурин[a, c]

[a] *Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, 119296 Россия*

[b] *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия*

[c] *Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия*

**e-mail: Irinakrsl81@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.04.2021 г.
После доработки 31.05.2021 г.
Принята к публикации 31.05.2021 г.

Механическое повреждение первичной нейрональной культуры служит удобной *in vitro* моделью для изучения молекулярно-клеточных механизмов, задействованных в распространении очага повреждения при механической травме мозга. В данной работе исследованы изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), Na^+ ($[Na^+]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в ответ на механическое повреждение первичной культуры корковых нейронов крысы. Быстрое (в течение 1–2 с) нанесение повреждения нейрональной сети в форме полосы ~3 × 0.1 мм вызывало скачкообразный рост $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ и резкое падение $\Delta\Psi_m$. В ~78% клеток, отреагировавших на травму культуры, происходило плавное восстановление указанных параметров до базального уровня. В остальных 22% возникала вторая фаза подъема $[Ca^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дисрегуляция, ОКД), синхронная с сильным падением $\Delta\Psi_m$. В таких клетках $[Na^+]_i$ оставалась на уровне высокого плато. Добавление инсулина (100 нМ) за 5 мин до нанесения механического повреждения уменьшало долю нейронов, имевших ОКД и устойчивое повышение $[Na^+]_i$. Таким образом, наличие инсулина способствует нормализации Ca^{2+}- и Na^+-гомеостаза и функционирования митохондрий, нарушенных при моделировании механической травмы мозга *in vitro*.

Ключевые слова: механическое повреждение мозга *in vitro*, глутаматная эксайтотоксичность, отсроченная кальциевая дисрегуляция, инсулин

DOI: 10.31857/S0233475521060062

ВВЕДЕНИЕ

Травматическое повреждение мозга является серьезной клинической проблемой, приводящей к смерти, развитию длительной потере трудоспособности и инвалидизации. Моделирование травматического повреждения мозга *in vitro* успешно используют для выяснения каскада молекулярных механизмов, приводящих к вторичному повреждению мозга, а также для поиска веществ, обладающих нейропротекторными свойствами [1–3]. Одним из лидирующих факторов гибели нейронов является чрезмерное повышение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), приводящее к кальциевой перегрузке митохондрий и нарушению их функционального состояния [4–6].

Ранее было показано, что источником повышения $[Ca^{2+}]_i$ при нанесении нейрональной культуре механической травмы служит внеклеточный Ca^{2+} [7, 8]. Было обнаружено, что MK801, ингибирующий ионотропные глутаматные каналы NMDA-типа, предотвращал повышение $[Ca^{2+}]_i$ в 99% нейронов [9]. Это свидетельствует о том, что основным путем поступления Ca^{2+} в нейроны служат ионные каналы NMDA-рецепторов. Недавно нами показано, что инсулин защищает первичные культуры нейроны от эксайтотоксического действия глутамата (Glu) [10]. Целью данной работы было выявить, способен ли инсулин оказывать нейропротекторное действие в тех случаях, когда изменение внутриклеточного ионного гомеостаза и нарушение функций митохондрий вызвано не экзогенным Glu, а эндогенным,

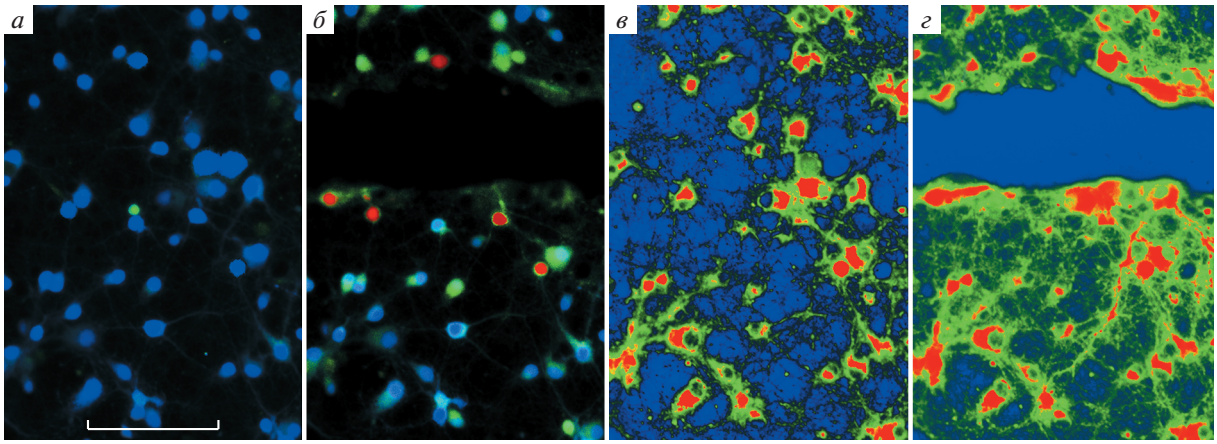

Рис. 1. Типичные флуоресцентные изображения первичной культуры кортикальных нейронов крысы, нагруженных Fura-FF (*а*, *б*) и Rhodamine123 (*в*, *г*) до нанесения царапины (*а*, *в*) и спустя 60 с после ее нанесения (*б*, *г*). Более теплый цвет флуоресцентных изображений Fura-FF соответствует увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в соме клеток; более теплый цвет флуоресцентных изображений Rh123 соответствует снижению $\Delta\Psi_m$ в соме и нейритах. Масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

выделяющимся в условиях, моделирующих механическую травму мозга *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на первичных культурах кортикальных нейронов крыс Вистар в возрасте 1–2 дня (возраст клеток в культуре 10–12 дней), приготовленных как описано в работе [10]. Травму нейрональной сети производили иглой, установленной в механическом манипуляторе, позволяющем наносить горизонтальную царапину длиной 2–3 мм и шириной 80–100 мкм в течение 1–2 с. Регистрацию флуоресцентных сигналов Ca^{2+}- и Na^+-индикаторов и потенциал-чувствительного митохондриального зонда производили с интервалом между кадрами 3 с до, во время и после нанесения повреждения в пределах 150 мкм от границы царапины. Измерения выполнены с помощью системы анализа изображения на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX-71. Для одновременных измерений $[Ca^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) использовали флуоресцентные зонды: Fura-FF (4 мкМ, 60 мин, возбуждение 340 ± 8 и 380 ± 8 нм, испускание 525 ± 15 нм) и потенциал-чувствительный зонд Rhodamine 123 (Rh123, 2.5 мкг/мл, 15 мин, возбуждение 485 ± ± 8 нм, испускание 525 ± 15 нм) соответственно. Для одновременных измерений внутриклеточной концентрации Na^+ ($[Na^+]_i$) и Ca^{2+} использовали флуоресцентные зонды: SBFI (8 мкМ, 60 мин, длины волн возбуждения и регистрации те же, что для Fura-FF) и Rhod-2 (1 мкМ, 60 мин, возбуждение 565 ± 8 нм, испускание 610 ± 15 нм) соответственно.

Все измерения выполнены в буферном растворе следующего состава (мМ): 130 NaCl, 5.4 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 глюкозы, 20 HEPES, pH 7.4. Добавление инсулина (100 нМ, свиной, Sigma-Aldrich, США) производили за 5 мин до нанесения травмы, и далее он присутствовал в растворе в течение всей процедуры измерений, за исключением периодов действия протонофора FCCP (1 мкМ) и калибровки сигналов Ca^{2+}-индикатора в конце экспериментов. Для калибровки максимального сигнала Fura-FF и Rhod-2 добавляли Ca^{2+}-ионофор иономицин (Iono, 2 мкМ, в присутствии 5 мМ Ca^{2+}), что приводило к насыщению индикатора ионами Ca^{2+}.

Изменения $[Ca^{2+}]_i$, измеренные с помощью Fura-FF, представлены как изменения отношения F_{340}/F_{380} и нормированы относительно исходного состояния в покоящихся клетках до нанесения травмы ($F_{340}/F_{380} = 0$) и после калибровки максимального сигнала ($F_{340}/F_{380} = 1$). Изменения $[Ca^{2+}]_i$, измеренные с помощью Rhod-2, представлены как изменения отношения F/F_o, где F и F_o соответственно текущее значение интенсивности флуоресценции и исходное в покоящихся клетках в начале эксперимента. Отношение F/F_o принято за 0 в покоящихся клетках и за 1 после калибровки максимального сигнала Rhod-2 с помощью иономицина. Изменения $[Na^+]_i$ представлены как изменения отношения F_{340}/F_{380} индикатора SBFI и нормированы относительно исходного значения в покоящихся клетках ($F_{340}/F_{380} = 1$).

Флуоресцентные индикаторы приобретены в ThermoFisher (США), остальные реагенты в Sigma-Aldrich.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США), непарный *t*-тест. Статистически значимыми считали различия при

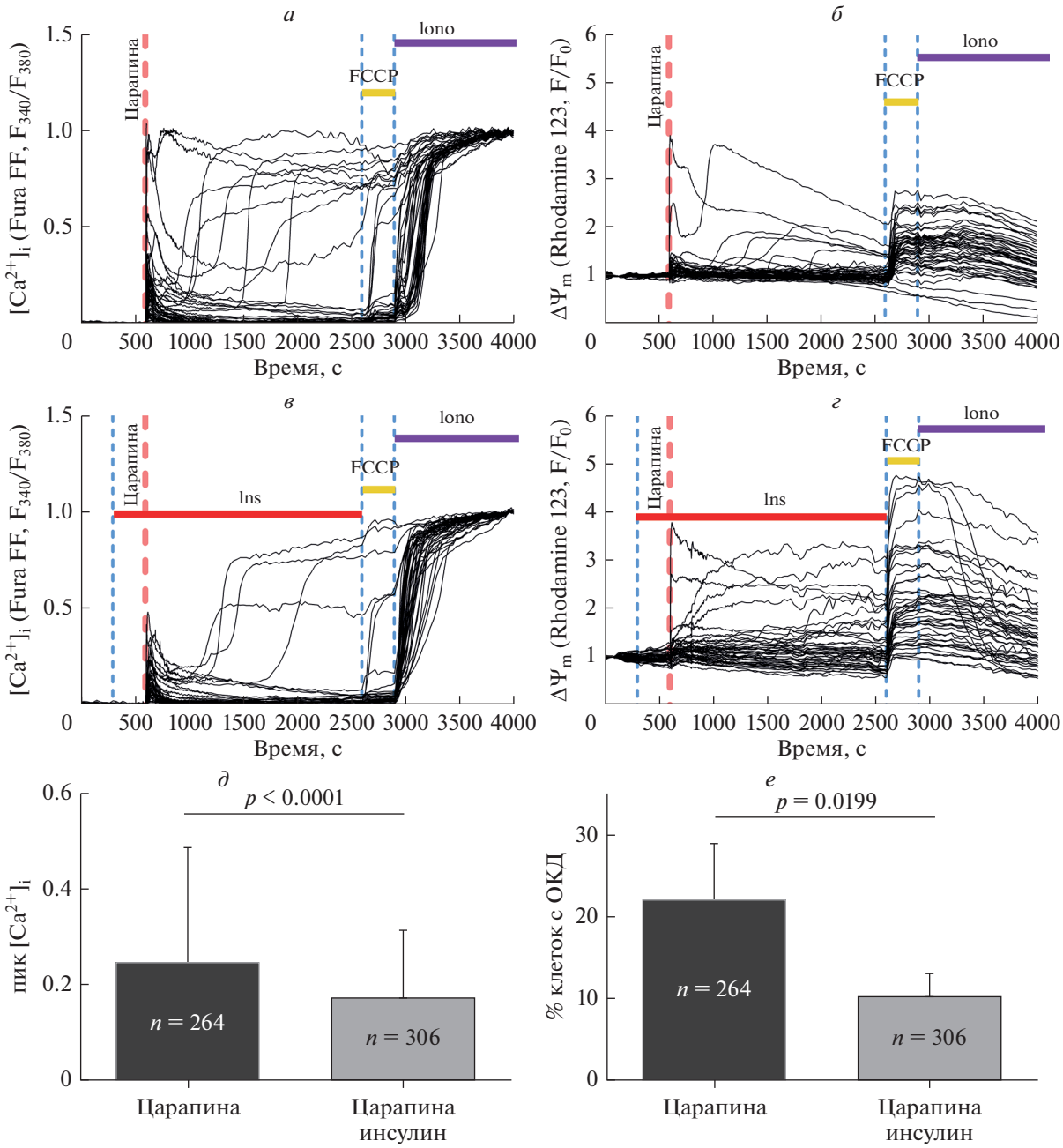

Рис. 2. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (*а* и *б*) и с добавлением инсулина (Ins, 100 нМ) (*в* и *г*). В каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов. Пиковые значения $[Ca^{2+}]_i$ (пик $[Ca^{2+}]_i$), отмечаемые в первые 120 с после нанесения царапины (*д*), и % клеток, в которых развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД) (*е*).

уровне вероятности $p < 0.05$. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, n – общее количество клеток во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Механическое повреждение первичной культуры кортикальных нейронов крысы приводит к быстрому увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и синхронному падению $\Delta\Psi_m$. Типичные изображения изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ до и после механического повреждения (нанесения царапины) представлены на рис. 1.

В 77.7 ± 9.1% клеток (n = 264, 4 эксперимента) эти изменения имели быстрый транзиторный характер с возвращением $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ к низкому

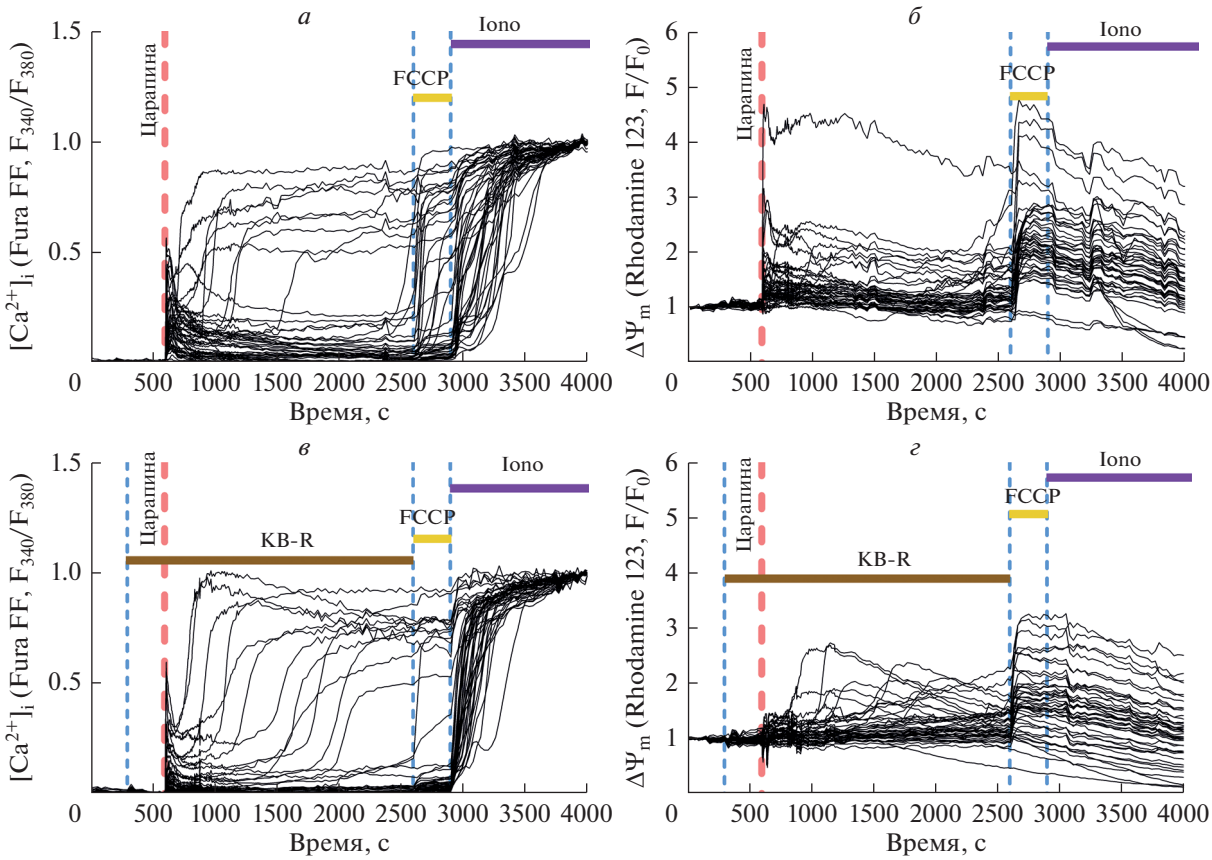

Рис. 3. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (*а* и *б*) и с добавлением KB-R7943 (10 мкМ) (*в* и *г*). В каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов.

значению. В остальных 22.3% происходило двухфазное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ с развитием устойчивого плато и митохондриальной деполяризацей (рис. 2*а*, 2*б*). Бо́льшая часть клеток (63 ± 7%), развивших двухфазный Ca^{2+}-ответ на травму, локализовалась в пределах 50 мкм от границы царапины. Подобные изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ наблюдаются при эксайтотоксическом действии экзогенного Glu на первичные нейрональные культуры мозга и получили название отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) [4–6]. В настоящем экспериментальном протоколе Glu не добавляли, однако этот нейромедиатор мог выделиться из клеток, разрушенных в результате нанесения механического повреждения. Это предположение подтверждается тем, что доля клеток, ответивших быстрым подъемом $[Ca^{2+}]_i$ на механическое повреждение многократно снижается в присутствии MK-801, что указывает на доминирующую роль ионотропных Glu-активируемых каналов NMDA-типа в реакции нейронов на повреждение [9]. Интересно, что в отличие от стандартных протоколов при изучении глутаматной эксайтотоксичности, использующих экзогенный Glu в безмагниевом буфере в присутствии глицина [4, 5, 10], при нанесении механической травмы ОКД развивалась не только без введения глицина, являющегося ко-агонистом NMDA-рецепторов, но и без удаления Mg^{2+}. Возможно, при механическом повреждении культуры выделяется не только эндогенный Glu, но и глицин, а также происходит быстрая деполяризация плазматической мембраны, снимающая потенциал-зависимую магниевую блокаду.

Добавление инсулина (100 нМ) за 5 мин до нанесения травмы само по себе не влияло на сигнал Fura-FF, однако приводило к достоверному снижению доли нейронов, имевших ОКД в результате повреждения культуры с 22.3 ± 9.1% до 10.3 ± 4.2% ($p = 0.02$, $n = 306$, 4 эксперимента) (рис. 2*е*). Доля нейронов, показавших синхронное с ОКД сильное падение $\Delta\Psi_m$, также уменьшалась (рис. 2*б*, 2*г*). Инсулин достоверно уменьшал пиковые значения $[Ca^{2+}]_i$ с 0.24 ± 0.01 до 0.17 ± 0.00, наблюдаемые в первые 2 мин после нанесения травмы ($p < 0.0001$, за 1 принята максимальная $[Ca^{2+}]_i$, достигаемая при добавлении иономицина) (рис. 2*д*).

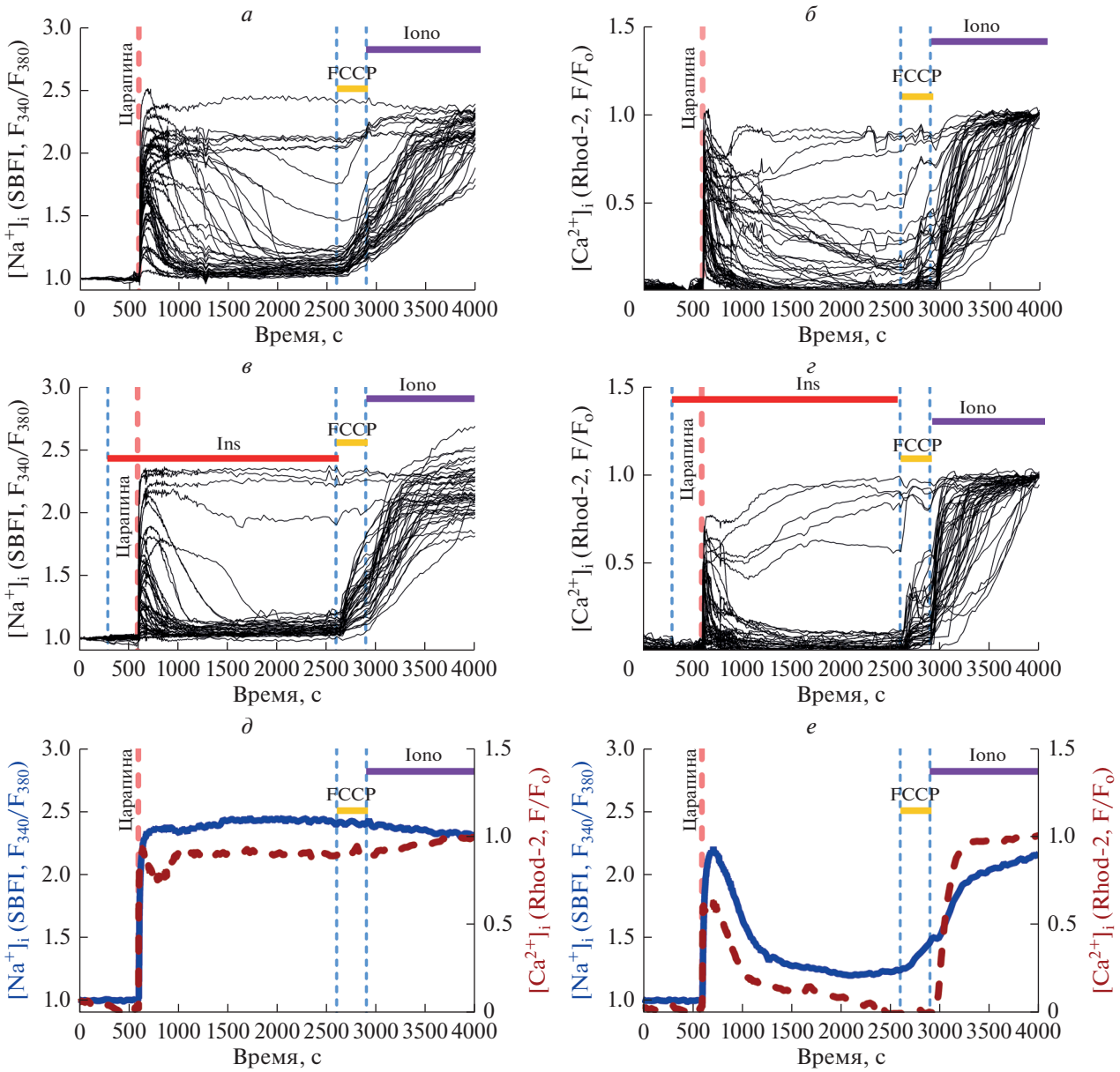

Рис. 4. Изменения $[Na^+]_i$ и $[Ca^{2+}]_i$ в первичной культуре кортикальных нейронов крысы, подвергнутой механическому повреждению с разрывом нейрональной сети в буферном растворе без (*а* и *б*) и с добавлением инсулина (Ins, 100 нМ) (*в* и *г*), в каждой группе представлено по 50 кривых, соответствующих сигналам индивидуальных нейронов. Сопоставление $[Na^+]_i$ и $[Ca^{2+}]_i$ сигналов в ответ на травму в двух представительных нейронах (*д* и *е*).

Добавление протонофора FCCP в конце эксперимента вызывало больший подъем флуоресценции Rh123 в тех культурах, которые содержали в буфере инсулин. Это свидетельствует о том, что в присутствии инсулина митохондрии удержали большее количество Rh123 в матриксе при механическом повреждении культуры и, соответственно, высвободили больше зонда в цитозоль при деполяризации с помощью FCCP (рис. 2*г*). Очевидно, митохондрии нейронов имели в присутствии инсулина более высокий $\Delta\Psi_m$, позволивший удержать большее количество Rh123.

Для развития ОКД при действии экзогенного Glu требуется не только активация NMDA-рецепторов, но и реверсия Na^+/Ca^{2+}-обменника [11]. Мы проверили, насколько ингибирование реверсивной моды Na^+/Ca^{2+}-обменника с помощью KB-R7943 важно для развития ОКД и сильного падения $\Delta\Psi_m$. Оказалось, что при механической травме нейрональной культуры и действии Glu, выделившегося в результате повреждения клеток, KB-R7943 (10 мкМ) не вызвал достоверного уменьшения доли клеток, имевших ОКД

(n = 167 в группе клеток, подвергшихся механическому повреждению; n = 158 в группе клеток предобработанных K-BR7943 и подвергшихся механическому повреждению, 3 эксперимента, $p > 0.05$) (рис. 3).

Известно, что NMDA-каналы обладают высокой проводимостью не только для Ca^{2+}, но и для Na^+ [4], поэтому мы проверили, происходят ли изменения $[Na^+]_i$ в нейронах в ответ на механическое повреждение культуры. Действительно, в ответ на царапину изменения $[Ca^{2+}]_i$ шли параллельно с изменениями $[Na^+]_i$ (рис. 4). Добавление инсулина приводило к уменьшению доли нейронов, которые в ответ на травму развивали устойчивое повышение $[Na^+]_i$ с 19.7 ± 2.3% (n = 211, 4 эксперимента) до 9.9 ± 2.4% (n = 204, 4 эксперимента, $p < 0.0012$). Это наблюдение согласуется с результатами измерения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2). Так же как и в случае измерений $[Ca^{2+}]_i$, инсулин достоверно уменьшал пиковые значения $[Na^+]_i$ с 1.77 ± ± 0.03 до 1.45 ± 0.03, наблюдаемые в первые 2 мин после нанесения повреждения ($p < 0.001$, за 1 принято стартовое значение $[Na^+]_i$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие ОКД является “точкой невозврата” при глутаматной нейротоксичности, и гибель таких нейронов в первичной культуре предопределена [12, 13]. Снижение доли клеток, имеющих $[Ca^{2+}]_i$-плато в *in vitro* модели травматического повреждения мозга, должно положительно сказываться на выживании нейронов вблизи травмированной зоны. Инсулин понижал амплитуду скачка $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 2*д*) и $[Na^+]_i$ (рис. 4) в момент нанесения царапины, что свидетельствует о способности этого гормона снижать поступление Ca^{2+} и Na^+ в клетку при механическом повреждении нейрональной сети *in vitro*. Снижение поступления Ca^{2+} в цитозоль из буфера уменьшает вероятность развития ОКД [14] и хорошо согласуется с результатами настоящего исследования (рис. 2*е*). С другой стороны, показано, что в гетерологических системах (в ооците лягушки) инсулин способен увеличивать экспрессию NMDA-рецепторов [15]. Однако электрофизиологические исследования на мозге крыс продемонстрировали, что эффект инсулина может быть разнонаправленным в зависимости от того, какие рецепторы вовлечены в нейротрансмиссию дополнительно к ионотропным рецепторам глутамата [16]. Кроме того, снижение в присутствии инсулина доли клеток, в которых повреждение вызывало длительное повышение $[Na^+]_i$, указывает на то, что инсулин способствовал более эффективной работе Na^+/K^+-ATP-азы (рис. 4). Это подтверждается тем, что в присутствии инсулина митохондрии нейронов имели более высокий $\Delta\Psi_m$, чем контрольные культуры без добавки гормона (рис. 2*б, 2г*), и хорошо согласуется с современными представлениями о более эффективной работе митохондрий по энергообеспечению нейронов в присутствии инсулина [17].

Мы не обнаружили реверсии Na^+/Ca^{2+}-обменника при механическом повреждении (рис. 3). Вероятно, снижение градиента концентрации Na^+ между буфером и цитозолем и падение трансмембранного потенциала плазмалеммы не достигали уровня, необходимого для реверсии Na^+/Ca^{2+}-обменника, которое реализуется при нейротоксическом воздействии глутамата [4, 5, 12, 13].

В заключение отметим, что обработка нейронов инсулином способствует нормализации Ca^{2+}- и Na^+-гомеостаза и функции митохондрий, нарушенных в результате разрыва нейрональной сети. Можно надеяться, что положительное действие инсулина проявляется не только на двумерной модели травмы мозга, механическом повреждении первичной нейрональной культуры, но также *in vivo.*

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Источники финансирования. Исследование поддержано грантами РФФИ 17-00-00106 и гос. заданием НИР № 0520-2019-0029 и АААА-А19-119012590191-3.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumaria A. 2017. In vitro models as a platform to investigate traumatic brain injury. *Altern. Lab. Anim.* **45** (4), 201–211. https://doi.org/10.1177/026119291704500405
2. Morrison B., Elkin B.S., Dollé J.-P., Yarmush M.L. 2011. In vitro models of traumatic brain injury. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **13** (1), 91–126. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124706
3. Lööv C., Shevchenko G., Geeyarpuram Nadadhur A., Clausen F., Hillered L., Wetterhall M., Erlandsson A. 2013. Identification of injury specific proteins in a cell culture model of traumatic brain injury. *PLoS One.* **8** (2), e55983. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055983
4. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 279–351. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
5. Duchen M.R. 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **464** (1), 111–121. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0

6. Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y. 2018. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **663**, 86–90. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.044
7. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W., Faden A.I. 1998. Mechanical injury to neuronal/glial cultures in microplates: Role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* **51** (6), 748–758. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980315)51:6<748::AID-JNR8>3.0.CO;2-B
8. Mukhin A.G. Ivanova S.A., Knoblach S.M., Faden A.I. 1997. New in vitro model of traumatic neuronal injury: Evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurotrauma.* **14** (9), 651–663. https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.651
9. Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Лисина О.Ю., Сурин А.М. 2018. Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме. *Патогенез.* **16** (3), 124–128.
10. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. 2019. Insulin protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity. *Front. Neurosci.* **13**, 1027. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01027
11. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. 2012. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na^+/Ca^{2+}-exchanger. *Neurobiol. Dis.* **46** (1), 109–117. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.051
12. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2014. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+}-дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов. *Патогенез.* **12** (4), 40–46.
13. Nicholls D. 2005. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr. Mol. Med.* **4** (2), 149–177. https://doi.org/10.2174/1566524043479239
14. Вабниц А.В., Сенилова Я.Е., Колесникова Е.В., Сурин А.М., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2006. Отсроченная Ca^{2+} дисрегуляция в молодых нейронах мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. Роль NMDA-каналов. *Биол. мембраны.* **23** (4), 311–319.
15. Skeberdis V.A., Lan J.Y., Zheng X., Zukin R.S., Bennett M.V.L. 2001. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** (6), 3561–3566. https://doi.org/10.1073/pnas.051634698
16. Fetterly T.L., Oginsky M.F., Nieto A.M., Alonso-Caraballo Y., Santana-Rodriguez Z., Ferrario C.R. 2021. Insulin bidirectionally alters NAc glutamatergic transmission: Interactions between insulin receptor activation, endogenous opioids, and glutamate release. *J. Neurosci.* **41** (11), 2360–2372. https://doi.org/10.1523/jneurosci.3216-18.2021
17. Pomytkin I., Pinelis V. 2021. Insulin receptors and intracellular Ca^{2+} form a double-negative regulatory feedback loop controlling insulin sensitivity. *F1000Research.* **9**, 598. https://doi.org/10.12688/f1000research.24558.2

Insulin Normalizes Ionic Homeostasis and the State of Mitochondria during Mechanical Trauma to the Culture of Brain Neurons

I. A. Krasilnikova[1, *], I. A. Pomytkin[2], V. G. Pinelis[1], A. M. Surin[1, 3]

[1]*National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119296 Russia*

[2]*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

[3]*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

**e-mail: Irinakrsl81@gmail.com*

Mechanical damage to the primary neuronal culture serves as a convenient *in vitro* model for studying the molecular and cellular mechanisms involved in the spreading of the lesion in mechanical trauma to the brain. In this work, we investigated changes in the intracellular concentrations of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) and Na^+ ($[Na^+]_i$) and in the mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) in response to mechanical damage to the primary culture of rat cortical neurons. Rapid (within 1–2 s) damage to the neural network in the form of a ~3 × 0.1 mm scratch caused an abrupt increase in $[Ca^{2+}]_i$ and $[Na^+]_i$ and a sharp drop in $\Delta\Psi_m$. In ~78% of the cells that responded to the culture trauma, these parameters gradually restored to the basal level. In the remaining 22% of the cells, there was a second phase of $[Ca^{2+}]_i$ rise (delayed calcium dysregulation, DCD), synchronous with a profound decrease in $\Delta\Psi_m$. In these cells $[Na^+]_i$ remained at a high plateau level. The addition of insulin (100 nM) 5 min before the mechanical damage caused a decrease in the proportion of neurons with DCD and a sustained increase in $[Na^+]_i$. Thus, the presence of insulin contributes to the normalization of Ca^{2+} and Na^+ homeostasis and mitochondrial function, which were impaired when simulating mechanical brain injury *in vitro*.

Keywords: mechanical brain damage *in vitro*, glutamate excitotoxicity, delayed calcium dysregulation, insulin

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 434–439

УДК 612.741.91

РОЛЬ АКТИВНОСТИ КИНАЗЫ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ 3 В РЕГУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ

© 2021 г. И. Д. Львова[a], *, К. А. Шарло[a], С. В. Рожков[a], Т. М. Мирзоев[a], Б. С. Шенкман[a]

[a]*Государственный научный центр Российской Федерации*
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия
**e-mail: irrrra1@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.04.2021 г.
После доработки 24.05.2021 г.
Принята к публикации 26.05.2021 г.

Функциональная разгрузка скелетных мышц наблюдается как в условиях микрогравитации у космонавтов, так и в земных условиях при постельном режиме, иммобилизации конечностей и различных опорно-двигательных нарушениях. Это состояние характеризуется полным или частичным устранением опорной афферентации, что приводит к исчезновению или значительному снижению сократительной активности постуральной камбаловидной мышцы, последующему “запуску” функциональной перестройки мышц, выражающейся в атрофии мышечных волокон, снижении уровня биогенеза митохондрий, трансформации миозинового фенотипа и, в конечном итоге, приводит к повышенной мышечной утомляемости (мышечной слабости). Киназа гликогенсинтазы 3 (GSK-3) способна регулировать как экспрессию медленной изоформы тяжелых цепей миозина, так и экспрессию ключевого фактора биогенеза митохондрий PGC1α; на основе этих данных мы предположили, что фармакологическое ингибирование GSK-3 на фоне 7 сут функциональной разгрузки (вывешивания) крыс способно предотвратить инактивацию биогенеза митохондрий в камбаловидных мышцах экспериментальных животных. Снижение экспрессии мРНК ключевого фактора биогенеза митохондрий PGC1α, наблюдаемое после 7 сут вывешивания, было предотвращено в группе с введением ингибитора GSK-3. Также было предотвращено снижение экспрессии ряда регуляторов биогенеза и функций митохондрий (TFAM, митофузинов-1 и -2, NRF-1 и NRF-2α) и содержания митохондриальной ДНК. Данные изменения в группе с ингибированием GSK-3 сопровождались частичным предотвращением снижения мРНК гена *myh7b*, что свидетельствует о возможной корегуляции экспрессии миозиновых генов и митохондриального биогенеза в камбаловидной мышце крысы в условиях функциональной разгрузки.

Ключевые слова: скелетная мышца, миозин, PGC1α, киназа гликогенсинтазы 3, биогенез митохондрий

DOI: 10.31857/S0233475521060074

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная разгрузка, наблюдаемая как в условиях микрогравитации при космическом полете, так и в земных условиях при моделировании микрогравитации (антиортостатическое вывешивание грызунов, модель “сухой” иммерсии с участием человека), а также при иммобилизации конечностей и постельном режиме, приводит к мышечной атрофии, снижению мышечного тонуса (атонии), снижению окислительных способностей мышц и трансформации мышечных волокон из “медленного” типа в “быстрый” [1]. В последние годы в нашей лаборатории было показано, что ингибирование киназы GSK-3 предотвращает снижение экспрессии медленной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ) в камбаловидной мышце крысы на фоне антиортостатического вывешивания [2]. Также по данным ряда работ, GSK-3 способна инактивировать экспрессию PGC1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), ключевого регулятора митохондриального биогенеза, на фоне функциональной разгрузки и в процессе миогенеза [3, 4]. Ряд литературных данных свидетельствует о том, что экспрессия медленной изоформы ТЦМ способна регулировать экспрессию ключевого фактора митохондриального биогенеза PGC1α за счет активации сигнального пути микроРНК-208/*myh7b*/микроРНК-499 [5, 6]. В процессе экспрессии мРНК гена *myh7*, кодирующего медленную изоформу ТЦМ, также происходит экспрессия микроРНК-208b, закодированной в одном из интронов этого гена. МикроРНК-208b способна индуцировать экспрессию гена *myh7b*, который

представляет собой древний ген одной из миозиновых изоформ, играющий в мышечных волокнах камбаловидной мышцы исключительно регуляторную роль. мРНК гена *myh7b* кодирует регуляторную микроРНК-499 [7]. Сверхэкспрессия микроРНК-499 в миотубах C2C12 приводит к усилению экспрессии медленной изоформы тропонина *tnni1*, миоглобина и PGC1α [8]. Таким образом, данная микроРНК играет важную роль в реализации окислительного фенотипа мышечного волокна. Влияние ингибирования GSK-3 на трансформацию миозинового фенотипа в условиях антиортостатического вывешивания было исследовано ранее, однако возможность предотвращения инактивации митохондриального биогенеза в условиях функциональной разгрузки путем ингибирования GSK-3 остается неисследованной. Таким образом, цель работы заключалась в исследовании влияния ингибирования GSK-3 на ряд параметров, регулирующих биогенез митохондрий и экспрессию гена *myh7b* в постуральной камбаловидной мышце крыс в условиях 7-суточного антиортостатического вывешивания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения эксперимента было отобрано 24 самца крыс линии Вистар массой 200 ± 10 г и возрастом 2.5 мес. Все животные содержались при температуре 20–25°C, вода и корм грызунам давались без ограничения в соответствии с рационом для лабораторных животных. Эксперимент был проведен согласно биоэтическим правилам проведения исследований на животных и одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 421, 14.04.2016). Для решения поставленной задачи в эксперименте проводилось моделирование гравитационной разгрузки в течение 7 сут по методу антиортостатического вывешивания Новикова–Ильина в модификации Morey-Holton [9, 10]. В соответствии с данным методом крысы были вывешены за хвост под углом 30 градусов к полу клетки таким образом, что передние конечности крысы опирались на пол, а задние конечности не касались пола. Животные были случайным образом разделены на 3 группы по 8 особей в каждой: C – группа виварного контроля; 7HS – группа, вывешенная на протяжении 7 сут; 7HS + G – группа, вывешенная на протяжении 7 сут, которой также ежедневно вводили AR-A014418 (ингибитор GSK-3) в дозировке 4 мг на 1 кг массы тела животных. Все препараты вводили внутрибрюшинно, растворенными в 1% DMSO в физрастворе в объеме 1.5 мл. Группам C и HS ежедневно вводили 1.5 мл раствора 1% DMSO в физрастворе. После проведения эксперимента у каждого животного под авертиновым наркозом (трибромэтанол, 240 мг/кг) из обеих ног были выделены камбаловидные мышцы, взвешены на аналитических весах и немедленно заморожены в жидком азоте. Замороженный биоматериал использовали для выделения тотальной РНК и ДНК, а также тотальной белковой фракции.

Для выделения тотальной белковой фракции и последующей оценки содержания в ней GSK-3β, фосфорилированной GSK-3β (Ser 9), гликогенсинтазы (GS) и фосфорилированной GS (Ser 641) был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Coctail (Santa Cruz), 10 мкг/мл апротинина (Sigma-Aldrich, США), 10 мкг/мл леупептина (Sigma-Aldrich) 10 мкг/мл пепстатина (Sigma-Aldrich), 20 мкл Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Швейцария), 40 мкл фосфоингибиторного коктейля (Santa Cruz). Содержание тотальной и фосфорилированной форм GSK-3β проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом, как было описано ранее [11]. Выявление целевых белков проводилось с помощью следующих первичных антител: p-GSK3β (Ser 9) (1 : 1000, #9322, Cell Signaling Technology, США), GSK-3β (1 : 1000, #12456, Cell Signaling Technology), p-glycogen synthase 1 (Ser 641) (1 : 10000, Abcam, США), anti-glycogen synthase 1 antibody (1 : 1000, ab40867, Abcam). В качестве вторичных антител использовались биотинилированные антитела goat anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz) в разведении 1 : 1000.

Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США) согласно рекомендациям производителя. Для синтеза кДНК использовали набор фирмы Синтол (Россия). Анализ экспрессии генов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) согласно рекомендациям производителя. Содержание митохондриальной ДНК определяли с помощью ПЦР в реальном времени, в качестве праймеров к митохондриальной ДНК использовали праймеры к COX I. Список использованных в работе праймеров представлен в табл. 1. Анализ данных ПЦР проводился по методу Pfaffl с учетом эффективностей амплификации [12]. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна. Достоверными считались различия с $p < 0.05$. В качестве референсного гена использовался *RPL19*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После 7 сут антиортостатического вывешивания мы обнаружили достоверное снижение уровня фосфорилирования GSK-3β по 9 остатку серина, что свидетельствует об активации данной киназы (рис. 1*a*) Введение ингибитора GSK-3 не

Таблица 1. Праймеры, использованные при проведении ПЦР-анализа в реальном времени

RPL19	5'-GTACCCTTCCTCTTCCCTATGC-3'; 5'-CAATGCCAACTCTCGTCAACAG-3'
myh7b	5'-GAGTGTGGAGCAGGTGGTATTT-3'; 5'-GGACCCCAATGAAGAACTGA-3'
PGC1α (*PPARGC1A*)	5'-GTGCAGCCAAGACTCTGTATGG-3'; 5'-GTCCAGGTCATTCACATCAAGTTC-3'
TFAM1	5'-CGCCTGTCAGCCTTATCTGTA-3'; 5'-TGCATCTGGGTGTTTAGCTTA-3'
NRF1	5'-TTACTCTGCTGTGGCTGATGG-3'; 5'-CCTCTGATGCTTGCGTCGTCT-3'
NRF2α	5'-AAGTGACGAGATGGGCCGC-3'; 5'-CGTTGTCCCCATTTTTGTG-3'
Митофузин-1	5'-CCACAGAGCTGGACATCTGG-3'; 5'-GAGAGCCGCTCATTCACCTT-3'
Митофузин-2	5'-AGTCGGTTGGAAGTCACTGT-3'; 5'-TGTACTCGGGCTGAAAGGAG-3'
COXI	5'-ATTGGAGGCTTCGGGAACTG-3'; 5'-AGATAGAAGACACCCCGGCT-3'
Медленная изоформа тропонина (*Tnni*)	5'-TCTCATCTGCACAGGAACCAAC3' 5'-TGGAGCTCTCGGCATAAGTC3'
Миоглобин	5'-GTGATGGGGAGTGGCAGATG3' 5'-ACTTGACCGGGATCTTGTGC3'

повлияло на уровень фосфорилирования GSK-3β, что было ожидаемо, поскольку принцип действия AR-A014418 не предполагает влияния на посттрансляционные модификации GSK-3β [13]. AR-A014418 является высокоселективным конкурентным ингибитором GSK-3, механизм действия которого основан на препятствии связывания ATP в активном центре фермента. Действие ингибитора было подтверждено с помощью оценки фосфорилирования гликогенсинтазы (GS) – ключевого субстрата GSK-3β.

После 7 сут антиортостатического вывешивания мы обнаружили достоверное повышение уровня фосфорилирования GS-1 по 641 остатку серина (рис. 1*б*), что свидетельствует об активации GSK-3β. Введение ингибитора GSK-3 снизило уровень фосфорилирования GS-1 до контрольного уровня.

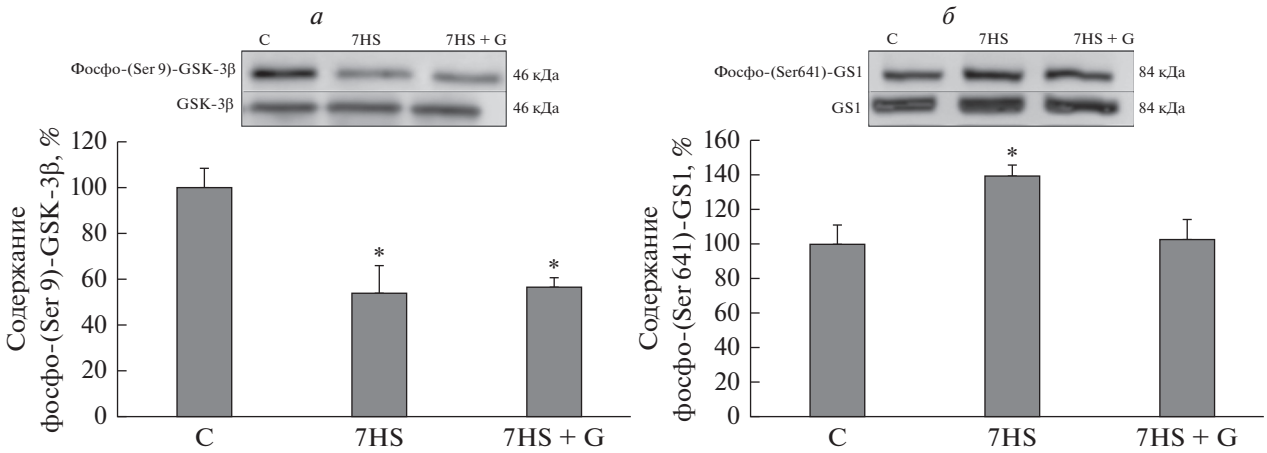

Рис. 1. Процент фосфорилирования GSK-3β по Ser 9 (*а*) и GS по Ser 641 (*б*) в камбаловидных мышцах крыс. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. C – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания, 7HS + G – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания с введением ингибитора GSK-3. * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0.05$).

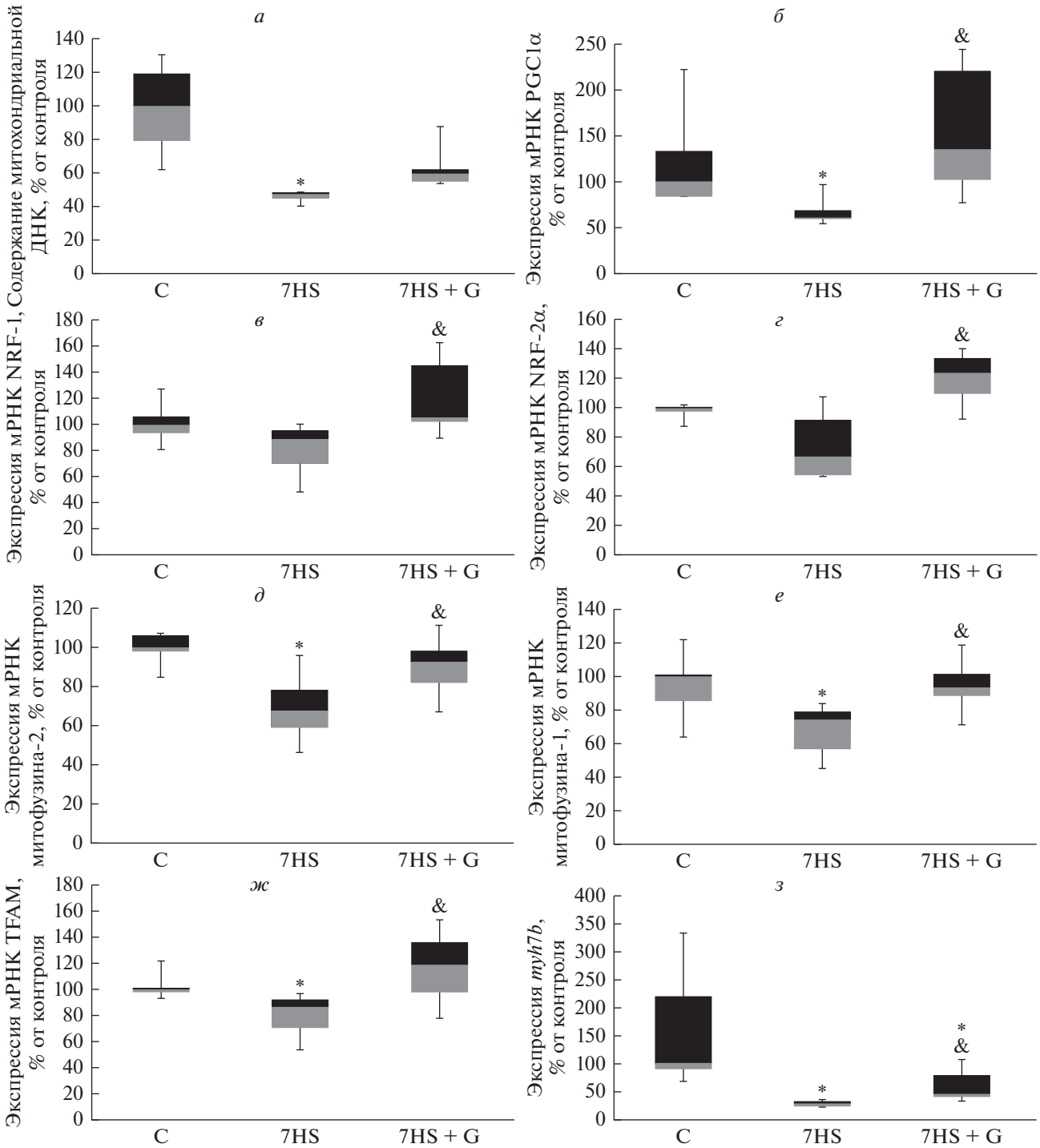

Рис. 2. Содержание митохондриальной ДНК (*а*), экспрессия мРНК PGC1α (*б*), экспрессия мРНК NRF-1 (*в*), экспрессия мРНК NRF-2α (*г*), экспрессия мРНК митофузина-2 (*д*), экспрессия мРНК митофузина-1 (*е*), экспрессия мРНК TFAM (*ж*), экспрессия мРНК *myh7b* (*з*) в камбаловидных мышцах крыс. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного интервала, а также максимумов и минимумов. C – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания, 7HS + G – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания с введением ингибитора GSK-3. * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0.05$), & – достоверные отличия от группы 7HS ($p < 0.05$).

После 7 сут антиортостатического вывешивания содержание митохондриальной ДНК в камбаловидной мышце животных достоверно снизилось вдвое в сравнении с контрольной группой (рис. 2*а*). Эти результаты соответствуют данным о снижении количества копий митохондриальной ДНК на фоне функциональной разгрузки, полученным другими авторами, и могут считаться

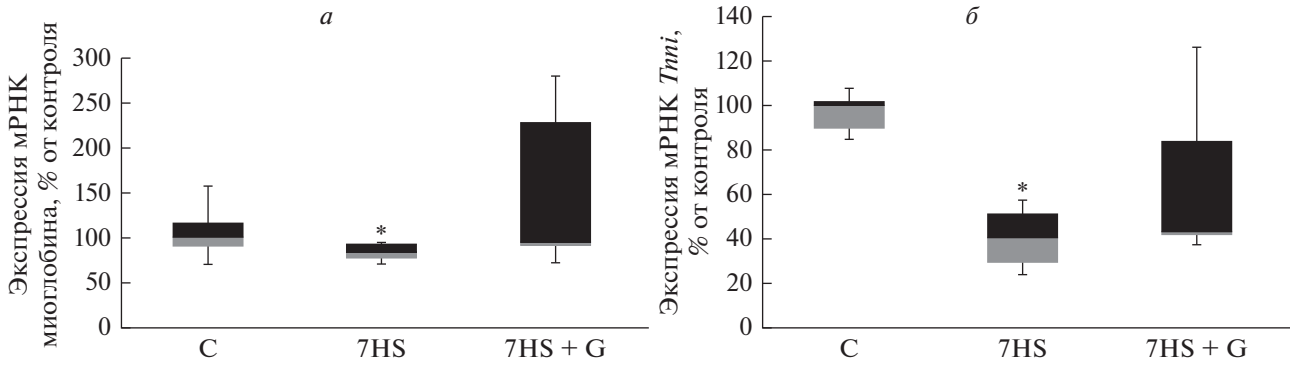

Рис. 3. Экспрессия мРНК гена миоглобина (*а*) и медленной изоформы тропонина (*Tnni*) (*б*) в камбаловидных мышцах крыс. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного интервала, а также максимумов и минимумов. C – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания, 7HS + G – группа 7-суточного антиортостатического вывешивания с введением ингибитора GSK-3. * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0.05$).

показателем снижения уровня биогенеза митохондрий в камбаловидных мышцах при вывешивании [4]. Также после 7 сут вывешивания мы обнаружили снижение уровня экспрессии мРНК ключевого регулятора биогенеза митохондрий PGC1α (рис. 2*б*), его мишени – фактора транскрипции митохондриальных генов TFAM (рис. 2*ж*), а также мРНК генов митофузина-1 (рис. 2*е*) и митофузина-2 (рис. 2*д*). Снижение других генов-мишеней PGC1α, NRF-1 и NRF-2α, являющихся коактиваторами транскрипции ряда генов, необходимых для биогенеза митохондрий, не было достоверным (рис. 2*б*–2*ж*). Введение ингибитора GSK-3 на фоне функциональной разгрузки привело к достоверному повышению содержания митохондриальной ДНК (рис. 2*а*), повышению экспрессии PGC1α (рис. 2*б*), митофузинов 1 (рис. 2*е*) и 2 (рис. 2*д*), а также TFAM (рис. 2*ж*) в сравнении со значениями в группе вывешивания с введением плацебо. Стоит отметить, что митофузины 1 и 2 принимают участие в регуляции слияния митохондрий и играют ключевую роль в адаптации мышц к упражнениям на выносливость [14]. Таким образом, GSK-3-зависимое снижение экспрессии данных белков может вносить вклад в развитие повышенной утомляемости скелетных мышц в условиях функциональной разгрузки. При этом введение ингибитора GSK-3 также привело к повышению экспрессии мРНК NRF-1 (рис. 2*в*) и NRF-2α (рис. 2*г*) в сравнении с группой вывешивания с введением плацебо. Таким образом, можно сделать вывод, что ингибирование GSK-3 приводит к предотвращению снижения биогенеза митохондрий, вероятно, посредством влияния на уровень экспрессии PGC1α. Эти результаты соответствуют данным, полученным ранее с использованием трансгенных животных [4].

Механизмы влияния GSK-3 на экспрессию PGC1α при функциональной разгрузке остаются неизвестными. Тем не менее известно, что микроРНК-499 способна активировать экспрессию PGC1α [6, 8, 15]. Мы обнаружили, что ингибирование GSK-3 приводит к частичному предотвращению снижения предшественника микроРНК-499, мРНК гена *myh7b*, в камбаловидных мышцах животных из группы 7HS + G. Также после 7 сут антиортостатического вывешивания мы обнаружили снижение экспрессии мРНК миоглобина и медленной изоформы тропонина (рис. 3), при этом в группе 7HS + G снижение уровня экспрессии данных генов было лишь частично предотвращено (рис. 3). С учетом того факта, что экспрессия этих генов способна регулироваться микроРНК-499, можно предположить, что GSK-3 регулирует их экспрессию за счет влияния на *myh7b*/микроРНК-499. Таким образом, не исключено, что и эффект GSK-3 на экспрессию PGC1α и митохондриальный биогенез по крайней мере частично осуществляется за счет микроРНК-зависимых регуляторных механизмов.

С учетом того, что GSK-3 является негативным регулятором экспрессии гена медленной изоформы ТЦМ [2], можно заключить, что активация GSK-3 на фоне антиортостатического вывешивания приводит к трансформации фенотипа мышечных волокон в постуральной мышце крысы: от “медленного” (окислительного и устойчивого к утомлению) к “быстрому” (гликолитическому, менее устойчивому к утомлению).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 17-75-20152.

Соответствие принципам этики. В настоящей статье все эксперименты были проведены с соблюдением всех биоэтических норм и одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 421, 14.04.2016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B. 2019. Cellular responses of human postural muscle to dry immersion. *Front. Physiol.* **10**, 1–11.
2. Sharlo K.A., Lomonosova Y.N., Turtikova O.V., Mitrofanova O.V., Kalamkarov G.R., Bugrova A.E., Shevchenko T.F., Shenkman B.S. 2018. The role of GSK-3β phosphorylation in the regulation of slow myosin expression in soleus muscle during functional unloading. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A. Membr. Cell Biol.* **12**, 85–91.
3. Theeuwes W.F., Gosker H.R., Langen R.C.J., Pansters N.A.M., Schols A., Remels A.H.V. 2018. Inactivation of glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) enhances mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1864** (9 Pt B), 2913–2926.
4. Theeuwes W.F., Gosker H.R., Langen R.C.J., Verhees K.J.P., Pansters N.A.M., Schols A., Remels A.H.V. 2017. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1863**, 3075–3086.
5. Gan Z., Rumsey J., Hazen B.C., Lai L., Leone T.C., Vega R.B., Xie H., Conley K.E., Auwerx J., Smith S.R., Olson E.N, Kralli A., Kelly D.P. 2013. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J. Clin.Invest.* **123**, 2564–2575.
6. Liu J., Liang X., Zhou D., Lai L., Xiao L., Liu L., Fu T., Kong Y., Zhou Q., Vega R.B., Zhu M., Kelly D.P., Gao X., Gan Z. 2016. Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnip1/AMPK circuit. *EMBO Mol. Med.* **8**, 1212–1228.
7. van Rooij E., Quiat D., Johnson B.A., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Kelm R.J. Jr., Olson E.N. 2009. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell.* **17**, 662–673.
8. Xu M., Chen X., Chen D., Yu B., Li M., He J., Huang Z. 2018. MicroRNA-499-5p regulates skeletal myofiber specification via NFATc1/MEF2C pathway and Thrap1/MEF2C axis. *Life Sci.* **215**, 236–245.
9. Ильин Е.А., Новиков В.Е. 1980. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях. *Косм. биол. мед.* **14** (3), 79–80.
10. Morey-Holton E.R., Globus R.K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects. *J. Appl. Physiol.* **92** (4), 1367–1377.
11. Sharlo K.A., Paramonova I.I., Lvova I.D., Vilchinskaya N.A., Bugrova A.E., Shevchenko T.F., Kalamkarov G.R., Shenkman B.S. 2020. NO-dependent mechanisms of myosin heavy chain transcription regulation in rat soleus muscle after 7-days hindlimb unloading. *Front. Physiol.* **11**, 1–12.
12. Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**, e45.
13. Bhat R., Xue Y., Berg S., Hellberg S., Ormö M., Nilsson Y., Radesäter A.C., Jerning E., Markgren P.O., Borgegård T., Nylöf M, Giménez-Cassina A., Hernández F., Lucas J. J., Díaz-Nido J., Avila J. 2003. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* **278** (46), 45937–45945.
14. Bell M.B., Bush Z., McGinnis G.R., Rowe G.C. 2019. Adult skeletal muscle deletion of Mitofusin 1 and 2 impedes exercise performance and training capacity. *J. Appl. Physiol.* **126**, 341–353.
15. Wang J.X., Jiao J.Q., Li Q., Long B., Wang K., Liu J.P., Li Y.R., Li P.F. 2011. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat. Med.* **17**, 71–78.

The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis in Rat Postural Muscle under Hindlimb Unloading

I. D. Lvova[1], *, K. A. Sharlo[1], S. V. Rozhkov[1], T. M. Mirzoev[1], B. S. Shenkman[1]

[1]*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia*

**e-mail: irrrra1@yandex.ru*

Mechanical unloading of skeletal muscles is observed both in microgravity conditions during space flight and on Earth during bed rest, immobilization, and neurological disorders. This condition is characterized by a complete or partial elimination of support afferentation, which leads to the disappearance or significant decrease in the contractile activity of the postural soleus muscle and subsequent skeletal muscle remodeling resulting in muscle fiber atrophy, a decrease in the level of mitochondrial biogenesis, transformation of the myosin phenotype, and increased muscle fatigue (muscle weakness). Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is able to regulate both the expression of the slow isoform of myosin heavy chains and the expression of the key factor of mitochondrial biogenesis PGC1α. On the basis of these data we suggested that pharmacological inhibition of GSK-3 during 7 days of rat hindlimb unloading (hindlimb suspension) can prevent the inactivation of mitochondrial biogenesis in soleus muscles of experimental animals. A decrease in mRNA expression of the key mitochondrial biogenesis factor PGC1α, observed after 7 days of unloading, was prevented in the unloading group treated with the GSK-3 inhibitor. The unloading-induced decrease in the expression of a number of regulators of mitochondrial biogenesis (TFAM, mitofusins-1 and -2, NRF-1 and NRF-2α) and the content of mitochondrial DNA was also prevented by the GSK-3 inhibitor. The observed changes in the hindlimb unloading + GSK-3 inhibitor group were accompanied by a partial prevention of the unloading-related decrease in *myh7b* gene mRNA indicating the possibility of co-regulation of slow myosin gene expression and mitochondrial biogenesis in rat soleus muscle under conditions of mechanical unloading.

Keywords: skeletal muscle, myosin, PGC1-α, glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), mitochondrial biogenesis

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 440–449

УДК 612.822.3

СЕКРЕЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ. ИЗМЕНЕНИЕ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ ПАННЕКСИНА 1 И ПРИ ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОМ НОКАУТЕ

© 2021 г.
А. С. Митева[a], *, А. Е. Гайдуков[a], О. П. Балезина[a]

[a] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия*

**e-mail: anka.miteva@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.04.2021 г.
После доработки 23.05.2021 г.
Принята к публикации 26.05.2021 г.

В нервно-мышечных синапсах диафрагмы мыши сопоставляли влияние на секрецию ацетилхолина (АХ) острой блокады паннексина 1 (за счет фармакологических агентов: пробенецида, мефлохина и ^{10}Panx1) и отсутствия его экспрессии за счет нокаута гена. Паннексины 1 образуют канал, который может пропускать в синаптическую щель АТР, влияя тем самым на нервно-мышечную передачу. Используя нервно-мышечные препараты мышей дикого типа, регистрировали миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные потенциалы концевой пластинки (ПКП) при воздействии различных блокаторов паннексина 1 и агониста $P2X_7$-рецепторов (BzATP). Полученные результаты сопоставляли с таковыми для мышей, нокаутных по гену паннексина 1. Отсутствие экспрессии за счет генетического нокаутирования или блокирование паннексина 1 под действием пробенецида или ^{10}Panx1 у мышей дикого типа само по себе не влияет на секрецию АХ, однако позволяет проявиться потенцирующему действию на секрецию АХ со стороны $P2X_7$-рецепторов при аппликации их агониста, чего не происходит без блокады паннексина 1. При этом в обоих случаях увеличение секреции АХ осуществляется за счет увеличения размера пула синаптических везикул, готовых к выбросу. Исходя из этого, сделан вывод, что отсутствие экспрессии гена паннексина 1 за счет нокаута и острое блокирование паннексина 1 одинаково влияет на секрецию АХ через уменьшение концентрации пуринов в синаптической щели и, вероятно, механизмы этого влияния схожи. В них вовлечен паннексин 1, как важный участник пуринергической регуляции работы моторного синапса: при его блокаде существенно изменяются условия активации пресинаптических пуринорецепторов.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, секреция АХ, паннексин 1, $P2X_7$-рецепторы, пробенецид, ^{10}Panx1, пул готовых к выбросу везикул

DOI: 10.31857/S0233475521060086

ВВЕДЕНИЕ

Паннексины – это белки с молекулярной массой порядка 50 кДа, способные образовывать гексамерные комплексы для осуществления трансмембранной канальной функции и проведения АТР и других метаболитов из клеток в межклеточную среду [1]. В последние годы паннексины описаны в составе мембран скелетных мышц, Шванновских клеток и, возможно, аксонов [2, 3]. Известно, что АТР, поступающая из мышцы через паннексины, способна активировать мышечные пуринорецепторы и регулировать метаболизм мышцы [3]. Однако могут ли “паннексиновые” источники пуринов, то есть поступающие в синаптическую щель посредством каналов паннексинов из мышцы, глиальных и других клеток, играть самостоятельную роль в пуринергической регуляции секреции ацетилхолина (АХ), остается не ясным. Для исследования этого вопроса используют разные процедуры острого блокирования каналов, образованных паннексинами 1, или животных с нокаутированным геном паннексина 1 [4]. Недавно мы показали, что при отсутствии экспрессии паннексина 1 за счет генетического нокаутирования у мышей наблюдаются определенные нарушения в активации пресинаптических пуринорецепторов со стороны эндогенных и экзогенных пуринов [5, 6]. Являются ли такие изменения результатом хронических перестроек системы пуринергической регуляции синапсов или они могут также проявляться и при

остром выключении паннексинов и соответствующих "паннексиновых" источников эндогенных пуринов в синапсах, остается не ясным. В связи с этим целью данной работы было сравнить изменения пуринергической регуляции работы моторных синапсов мыши в условиях отсутствия экспрессии паннексина 1 за счет генетического нокаутирования и фармакологического выключения активности паннексина 1, блокируя, таким образом, этот источник эндогенных пуринов в синапсах. Для этого использовали регистрацию спонтанной и вызванной электрической активности в моторных синапсах мышей с генетическим нокаутом паннексина 1 или при остром фармакологическом блокировании паннексина 1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы (*m. diaphragma–n. phrenicus*) взрослых мышей дикого типа (WT) линии C57/Bl6 и мышей, нокаутных по гену паннексина 1 ($Panx1^{-/-}$) обоих полов [7]. Содержание мышей соответствовало директиве 86/609/EEC по обращению человека с лабораторными животными. Всего в исследованиях было использовано 21 животное. Умерщвление животных перед электрофизиологическими экспериментами производилось посредством быстрой декапитации.

Электрофизиология. Эксперименты проводились при температуре 20–22°C. Препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом помещали в камеру объемом 3 мл, перфузируемую оксигенированным (95% O_2, 5% CO_2) раствором Лайли (pH 7.2–7.4), содержащим (мМ): NaCl – 135, KCl – 4, NaH_2PO_4 – 0.9, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 1, $NaHCO_3$ –16.3, глюкоза – 11 (все реактивы поставлены Sigma–Aldrich, США). Исследование спонтанной активности синапсов проводили на нерассеченном препарате. Для предотвращения сокращений мышечных волокон при регистрации вызванной стимуляцией нерва синаптической активности мышечные волокна частично рассекали, используя стандартный протокол [8]. Непосредственно после поперечного рассечения мышечных волокон нервно-мышечный препарат помещали в емкость, содержащую 150 мл раствора Лайли не менее чем на 1 ч для удаления продуктов, выделившихся из рассеченных мышечных волокон и предотвращения блокады проведения потенциала действия по нерву. Это приводило к стабилизации мембранного потенциала мышечных волокон на сниженном по сравнению с нерассеченными волокнами уровне (порядка –50 мВ), что предотвращало сокращение мышцы при стимуляции нерва. Внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и вызванных стимуляцией нерва мультиквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 M KCl (сопротивление кончика микроэлектрода 10–20 МОм). Для регистрации вызванной ритмической активности диафрагмальный нерв стимулировали залпами сверхпороговых импульсов длительностью 0.08–0.1 мс с частотой 50 Гц в течение 1 с. Для предотвращения "утомления" синаптической передачи и возможного снижения амплитуд постсинаптических потенциалов, не связанного с действием исследуемых веществ, перерывы между стимуляциями составляли не менее 4 мин. Непосредственно перед стимуляцией нерва проводили регистрацию МПКП в течение 60–100 с (среднее значение амплитуд МПКП, зарегистрированных в этот период, использовали для вычисления квантового состава ПКП). Сигналы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) и записывали их с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 6.0 (ДИСофт, Россия) на жесткий диск компьютера. Программное обеспечение MiniAnalysis (Synaptosoft, США) использовали для первичного анализа данных. В контроле регистрировали МПКП и ПКП от 4 и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, и далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 40–60 мин. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали мембранный потенциал, амплитуду и временнóй ход МПКП и ПКП, а также квантовый состав ПКП. Для каждого конкретного синапса регистрировали мембранный потенциал мышечного волокна. В случае регистрации МПКП у интактных мышечных волокон для нивелирования различий движущей силы потенциала на амплитуду синаптических токов стандартизировали значение амплитуд МПКП к величине МП = –70 мВ, а на рассеченном препарате аналогичным образом стандартизировали значения амплитуд МПКП и ПКП, регистрируемых в разных синапсах, к величине МП = –50 мВ. Для расчета квантового состава ПКП производили корректировку амплитуды ПКП на нелинейную суммацию [9], далее делили полученное значение на стандартизованную амплитуду МПКП. Для оценки временнóго хода ПКП вычисляли время спада их амплитуды, начиная от пика ПКП до момента уменьшения амплитуды ПКП на 90% от максимума. Для сравнения параметров секреции АХ у WT мышей и $Panx1^{-/-}$ мышей использовали случайную выборку из 45 синапсов в каждой группе. Сравнивали

Таблица 1. Сравнение средних значений основных анализируемых характеристик у мышей дикого типа (WT) и мышей, нокаутных по гену паннексина 1 ($Panx1^{-/-}$). Каждое значение – результат усреднения показателей не менее чем 45 синапсов, случайно выбранных из разных экспериментов

Параметр	WT	$Panx1^{-/-}$
МП, мВ	38.73 ± 0.81	37.81 ± 0.78
Амплитуда МПКП, мВ	1.09 ± 0.08	1.10 ± 0.07
Частота МПКП, Гц	0.86 ± 0.10	0.78 ± 0.12
Амплитуда ПКП, мВ	22.31 ± 1.89	22.84 ± 1.91
Квантовый состав ПКП	33.42 ± 1.11	33.71 ± 1.01

мембранный потенциал, амплитуду, квантовый состав первого ПКП в залпе, амплитуду МПКП.

Расчет размера пула везикул, готовых к выбросу (RRP) производили, исходя из предположения, что уменьшение квантового состава ПКП по ходу залпа, когда наблюдается последовательное снижение амплитуд ПКП – депрессия нервно-мышечной передачи в залпе ПКП – при высокочастотной ритмической активности происходит из-за истощения RRP, а наступающая после стадия плато отражает баланс между истощением RRP и рекрутированием в него новых везикул. Исходя из этого, для оценки RRP для каждого синапса строили график количества квантов, выбрасываемых при каждом стимуле относительно суммарного количества везикул [10, 11]. В этом случае значение RRP вычисляли как экстраполяцию линейной регрессии участка депрессии залпа на ось X [11]. Значение вероятности выброса рассчитывали, как отношение количества квантов, выделившихся во время первого ПКП, к RRP [11, 12].

Для статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивалась с помощью теста Д'Агостино–Пирсона. Для оценки амплитуды и частоты МПКП, показателей временнóго хода ПКП в случае нормально-распределенных величин применяли *t*-критерий Стьюдента, в случае распределения отличающегося от нормального – критерий Манна–Уитни. Для анализа амплитуды и квантового состава ПКП применяли двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Тьюки. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, уровень значимости $p = 0.05$ (n – количество исследованных синапсов).

Материалы. В работе использовали в качестве блокаторов паннексина 1: мефлохина гидрохлорид (ApexBio Technology, США), водорастворимую форму пробенецида натриевую соль (AAT Bioquest, США), ^{10}Panx1 – пептидный фрагмент WRQAAFVDSY, являющийся пептидным ингибитором канала паннексина 1 (ApexBio Technology); а также BzATP (Sigma–Aldrich). Для приготовления стоковых растворов использовали деионизированную воду.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первая часть исследования была направлена на то, чтобы выявить возможные отличия в параметрах секреции АХ у мышей $Panx1^{-/-}$, по сравнению таковыми для мышей WT. Для этого использовали анализ параметров спонтанных МПКП, а также ПКП в условиях ритмических залпов ПКП (табл. 1).

Оказалось, что ни один из указанных параметров МПКП и ПКП в диафрагмальных синапсах $Panx1^{-/-}$ мышей не отличался статистически значимо от таковых в синапсах мышей WT. Таким образом, мы подтвердили опубликованные ранее наши данные [5], указывающие на отсутствие различий в параметрах синаптической активности моторных синапсов при отсутствии экспрессии паннексина 1 из-за нокаута соответствующего гена. Однако, как показал более детальный анализ, проведенный в наших предыдущих исследованиях, несмотря на кажущуюся сохранность и неизменность характера активности синапсов у $Panx1^{-/-}$ мышей по сравнению с WT, на самом деле имеют место серьезные нарушения баланса пуринергических тормозных и облегчающих влияний на секрецию АХ у синапсов таких мышей [5]. У $Panx1^{-/-}$ мышей мы наблюдали ограничение эндогенной активации одних рецепторов (например, A_1-рецепторов аденозина) [5] и облегчение активации других (например, $P2X_7$-рецепторов ATP) [6]. В частности, активация пресинаптических $P2X_7$-рецепторов моторных синапсов BzATP (30 мкМ), используемого в микромолярном диапазоне в нервно-мышечных синапсах и других объектах в качестве агониста $P2X_7$-рецепторов [6, 13–15], у $Panx1^{-/-}$ мышей вызывала потенцирование вызванной секреции АХ, чего не наблюдалось в синапсах WT мышей. Потенцирующее влияние на вызванный выброс АХ проявлялось в единообразном увеличении амплитуды и квантового состава первого и последу-

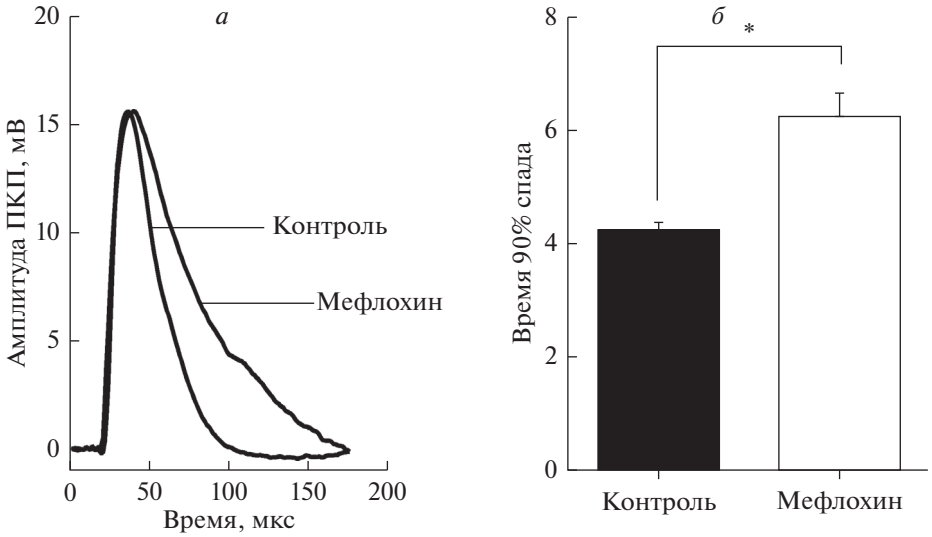

Рис. 1. Временно́й ход ПКП в контроле и на фоне 10 мкМ мефлохина: *а* – Оригинальные записи первого ПКП в залпе в контроле и под действием мефлохина; *б* – средние значения времени 90% спада первого ПКП в контроле и под действием мефлохина, $*p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ющих ПКП по всему ходу ритмического залпа при активации $P2X_7$-рецепторов.

Известно, что при изменении экспрессии тех или иных белков возможна функциональная перестройка регуляторных систем синапсов за счет изменения работы синаптических рецепторов или других компонентов, ответственных за показатели секреторной активности синапсов [16]. В связи с этим оставался открытым вопрос: являются ли наблюдаемые изменения пуринергической регуляции у $Panx1^{-/-}$ мышей результатом системных перестроек в синапсах в связи с нокаутом гена паннексина 1, либо аналогичный характер изменений пуринергической регуляции может проявляться даже при остром выключении активности паннексинов и “паннексинового” источника пуринов?

Для решения этого вопроса далее мы исследовали влияние на секрецию АХ фармакологической блокады паннексина 1. Для этого использовали три блокатора: мефлохин (10 мкМ) [17], пробенецид (1 мМ) [18] и пептидный ингибитор ^{10}Panx1 (10 мкМ). Оказалось, что мефлохин не вызывает значимых изменений амплитуды МПКП – значение этого параметра составило 1.26 ± 0.11 мВ ($n = 22$) в контроле и 1.49 ± 0.07 на фоне блокатора паннексина 1 ($n = 27$, $p > 0.05$). Амплитуда и квантовый состав ПКП под действием мефлохина статистически значимо не изменялись по сравнению с контролем. Так, квантовый состав первого ПКП в контроле составил 30.55 ± 2.31 ($n = 19$), а при действии мефлохина – 32.08 ± 2.77 ($n = 13$, $p > 0.05$). При этом мефлохин вызывал значимое увеличение времени спада ПКП (рис. 1). Согласно исследованиям, проведенным в рамках тестирования мефлохина как потенциального лекарства от малярии, данный препарат обладает способностью ингибировать работу ацетилхолинэстеразы, что, по-видимому, приводит к пролонгированию действия АХ в синаптической щели и вызывает увеличение длительности МПКП и ПКП [19]. В связи с проявлением эффекта, вероятно не связанного с непосредственной работой паннексинов, в дальнейших исследованиях мефлохин не применяли.

Аппликация пептидного ингибитора паннексина 1 ^{10}Panx1 не приводила к изменениям секреции АХ у WT мышей. Квантовый состав первого ПКП в залпе в контроле составил 26.01 ± 1.39 ($n = 15$), а на фоне ^{10}Panx1 23.82 ± 2.39 ($n = 13$, $p > 0.05$); временны́е характеристики ПКП также не изменились. Аналогичный эффект наблюдался и при применении пробенецида: значение квантового состава первого ПКП в контроле составило 31.26 ± 2.04 ($n = 15$), под действием пробенецида – 32.26 ± 2.15 ($n = 14$, $p > 0.05$). В отдельной серии экспериментов мы также установили, что и в синапсах $Panx1^{-/-}$ мышей оба вещества, блокирующих функционирование паннексинов 1, не влияли ни на квантовый состав ПКП, ни на другие параметры передачи.

Таким образом, острая фармакологическая блокада паннексина 1 при помощи пробенецида или ^{10}Panx1 не влечет за собой изменений параметров вызванной и спонтанной секреции АХ. Такие последствия совпадают с картиной неизменных параметров спонтанной и вызванной секреции АХ, зарегистрированных и в синапсах $Panx1^{-/-}$ мышей. Это косвенно свидетельствует о

сходстве функциональных изменений в регуляции функционирования моторных синапсов при острой блокаде паннексина 1 и при нокауте соответствующего гена, и об отсутствии радикальных перестроек в рецепторных белках или других структурах нервно-мышечных синапсов у Panx1$^{-/-}$ мышей по сравнению с синапсами WT мышей, подвергшихся острой фармакологической блокаде паннексинов 1.

Вместе с тем, как уже было отмечено выше, ранее мы показали, что одним из важных последствий отсутствия экспрессии паннексина 1 за счет генетического нокаутирования является частичное "растормаживание" активности P2X$_7$-рецепторов и возможность наблюдать потенцирующее действие P2X$_7$-рецепторов на вызванную секрецию АХ при их активации экзогенным агонистом BzATP [6]. Поэтому важно было сравнить, происходит ли аналогичное растормаживание и облегчение активации P2X$_7$-рецепторов, и как выглядит изменение квантового состава ПКП под действием BzATP в условиях острой блокады паннексина 1 с помощью ^{10}Panx1 или пробенецида.

Оказалось, что пробенецид хотя сам по себе и не изменяет параметры вызванного выброса АХ, но при этом позволяет проявиться потенцирующему действию агониста P2X$_7$-рецепторов в отношении квантового состава ПКП. Значение квантового состава ПКП значимо увеличивалось по всему ходу залпа ПКП на 30–50% под действием BzATP в присутствии пробенецида (рис. 2). Аналогичные изменения наблюдались при аппликации BzATP и на фоне другого ингибитора канала паннексина 1 – ^{10}Panx1: в этом случае увеличение квантового состава ПКП по ходу залпа составило 25–55% (рис. 3).

Ранее в наших исследованиях, посвященных исследованию механизмов потенцирующего действия P2X$_7$-рецепторов на квантовый состав ПКП при нокауте гена паннексина 1, проводился анализ возможных причин повышения квантового состава ПКП в залпе. Согласно современным моделям функционирования машинерии экзоцитоза и синаптической пластичности [11], увеличение квантового состава может быть связано с возрастанием вероятности выброса квантов АХ или с увеличением в нервной терминали числа непосредственно готовых к высвобождению квантов (RRP). Проведенный расчет размера RRP показал, что индуцируемое агонистом P2X$_7$-рецепторов устойчивое и равномерное возрастание квантового состава ПКП у всех ПКП в залпе обусловлено именно увеличением пула синаптических везикул, готовых к выбросу в активных зонах моторных терминалей, но не повышением вероятности выброса квантов АХ из первоначально готового к высвобождению пула [6].

В настоящей работе мы также проверяли, наблюдается ли такой же механизм увеличения квантового состава ПКП в синапсах при острой блокаде паннексинов или же он проявляется только в синапсах Panx1$^{-/-}$ мышей под влиянием долгосрочных эффектов отсутствия экспрессии паннексина 1 и синаптических перестроек. Для этого на основании анализа изменений квантового состава ПКП по ходу залпа, регистрируемых на фоне ^{10}Panx1 и последующей аппликации BzATP, рассчитали изменение размера RRP. Оказалось, что, как и в случае синапсов Panx1$^{-/-}$ мышей, пул везикул, готовых к выбросу, существенно увеличивается от 845.6 ± 63.6 (n = 18) в контроле, до 1261.0 ± 71.0 на фоне совместной аппликации ^{10}Panx1 и BzATP (n = 16, p < 0.05) (рис. 4*а*). При этом вероятность секреции квантов АХ не отличалась в контроле и в присутствии агониста P2X$_7$-рецепторов при действии пептидного ингибитора паннексина 1 (рис. 4*б*). Следовательно, сохраняется не только феномен облегченной активации P2X$_7$-рецепторов и их способность увеличивать выброс квантов АХ, но и механизм потенцирующего влияния на секрецию АХ, вероятно, совпадает в случае генетической и фармакологической блокады паннексина 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный в данной работе сравнительный анализ последствий острой фармакологической блокады или нокаута гена паннексина 1 в моторных синапсах диафрагмы мыши показал, что такие последствия в отношении регуляции вызванной секреции квантов АХ – одинаковы. В обоих случаях отсутствовали достоверные изменения параметров МПКП в покое и ПКП в ходе ритмической вызванной активности синапсов. Это могло бы означать отсутствие влияния поступающей во внеклеточную среду через каналы, образованные паннексином 1 АТР и ее образующихся метаболитов, на регуляцию работы синапсов. Однако анализ активности пресинаптических пуринорецепторов (в частности, P2X$_7$-рецепторов) как регуляторов секреции АХ показал, что в обоих случаях наблюдаются идентичные сдвиги в пуринергических влияниях на работу синапсов, выражающиеся в частности, в появлении у P2X$_7$-рецепторов способности потенцировать нервно-мышечную передачу при их активации BzATP, не наблюдавшейся ранее при наличии функционирующих паннексинов 1.

По данным литературы, выключение активности паннексинов под действием фармакологических агентов (пробенецид и др.) или за счет генетического нокаутирования [2, 20] действительно может приводить к уменьшению количества АТР, поступающей из глиальных [21, 22], мышечных [23]

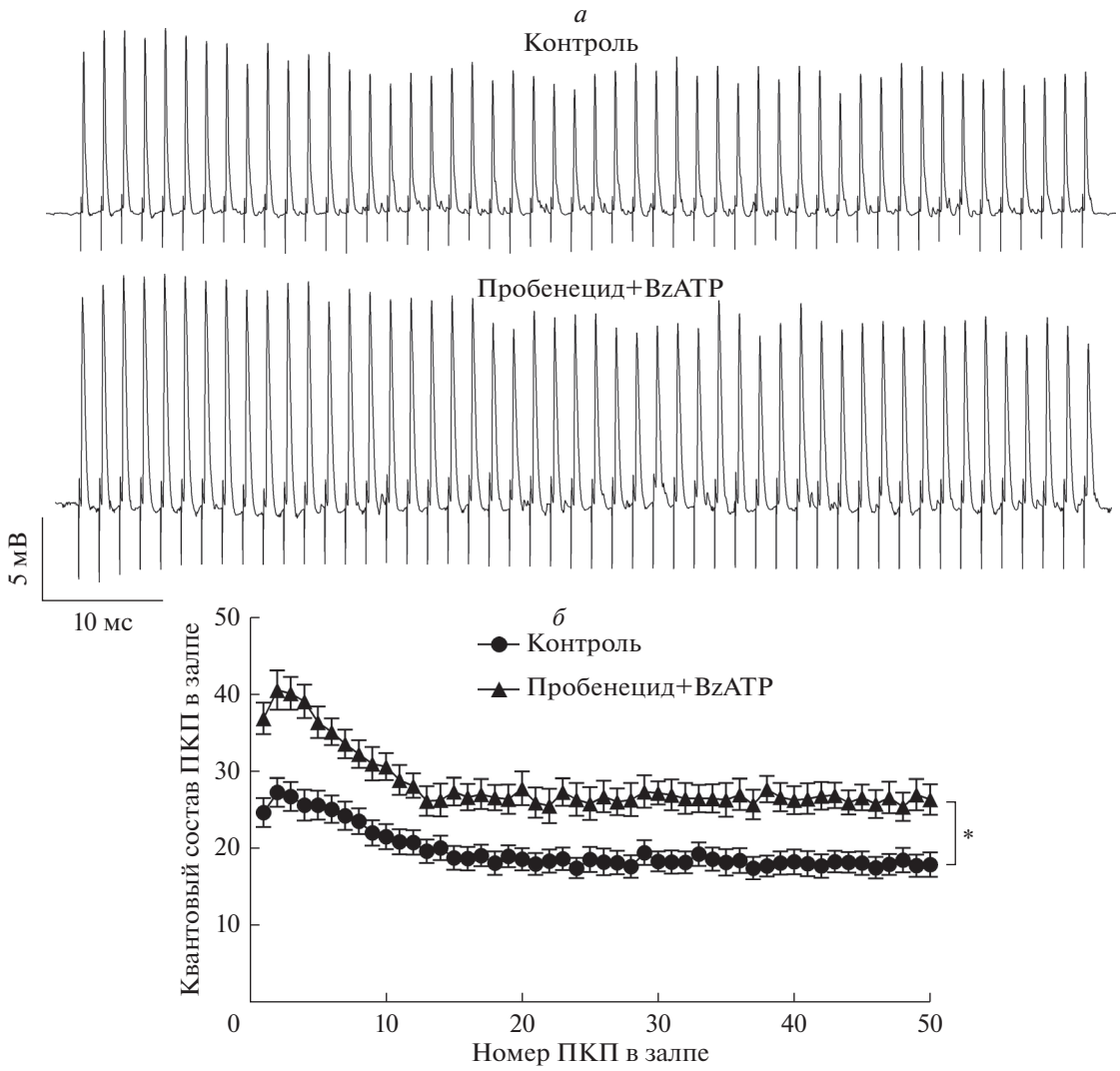

Рис. 2. Влияние аппликации агониста P2X7-рецепторов на вызванную активность моторных синапсов при блокировании паннексина 1 пробенецидом: *а* – примеры оригинальных записей ПКП в контроле и на фоне 1 мМ пробенецида совместно с 30 мкМ BZATP; *б* – изменения квантового состава ПКП по ходу залпа ПКП в контроле (n = 16) и на фоне 1 мМ пробенецида совместно с 30 мкМ BZATP (n = 12) в нервно-мышечных препаратах диафрагмы WT мышей. *$p < 0.05$ по сравнению с контролем.

или других клеточных источников в межклеточную среду. Среди прочих эффектов такой блокады описаны изменения и параметров синаптической передачи в центральной нервной системе (ЦНС) [24, 25]. В случае отсутствия экспрессии паннексина 1 из-за нокаута соответствующего гена отмечены также возможные изменения плотности рецепторов в синапсах [16]. Однако в нашей работе наблюдаемые изменения, касающиеся пуринергической регуляции синапсов, совпали как при генетическом нокаутировании, так и при остром фармакологическом блокировании паннексинов. Эти изменения, по-видимому, были связаны не столько со структурными изменениями в моторных синапсах или плотности рецепторов, сколько с изменением баланса тормозных и потенцирующих влияний на секрецию АХ со стороны пуринов в синапсах при выключении паннексинового источника АТР [5, 6]. Это совпадает с данными ряда работ, где также сопоставлялось действие фармакологического блокирования и генетического нокаутирования паннексина 1 на функционирование структур ЦНС. В них было показано, что и нокаут паннексина 1 и острое блокирование каналов, образуемых этими белками, сопровождается сходными эффектами [4, 25]. В нашей работе впервые в моторных синапсах мыши также описан одинаковый паттерн изменений в секреции АХ в ответ на действие пуринов как при остром ингибировании паннексинов 1, так и при нокауте их гена.

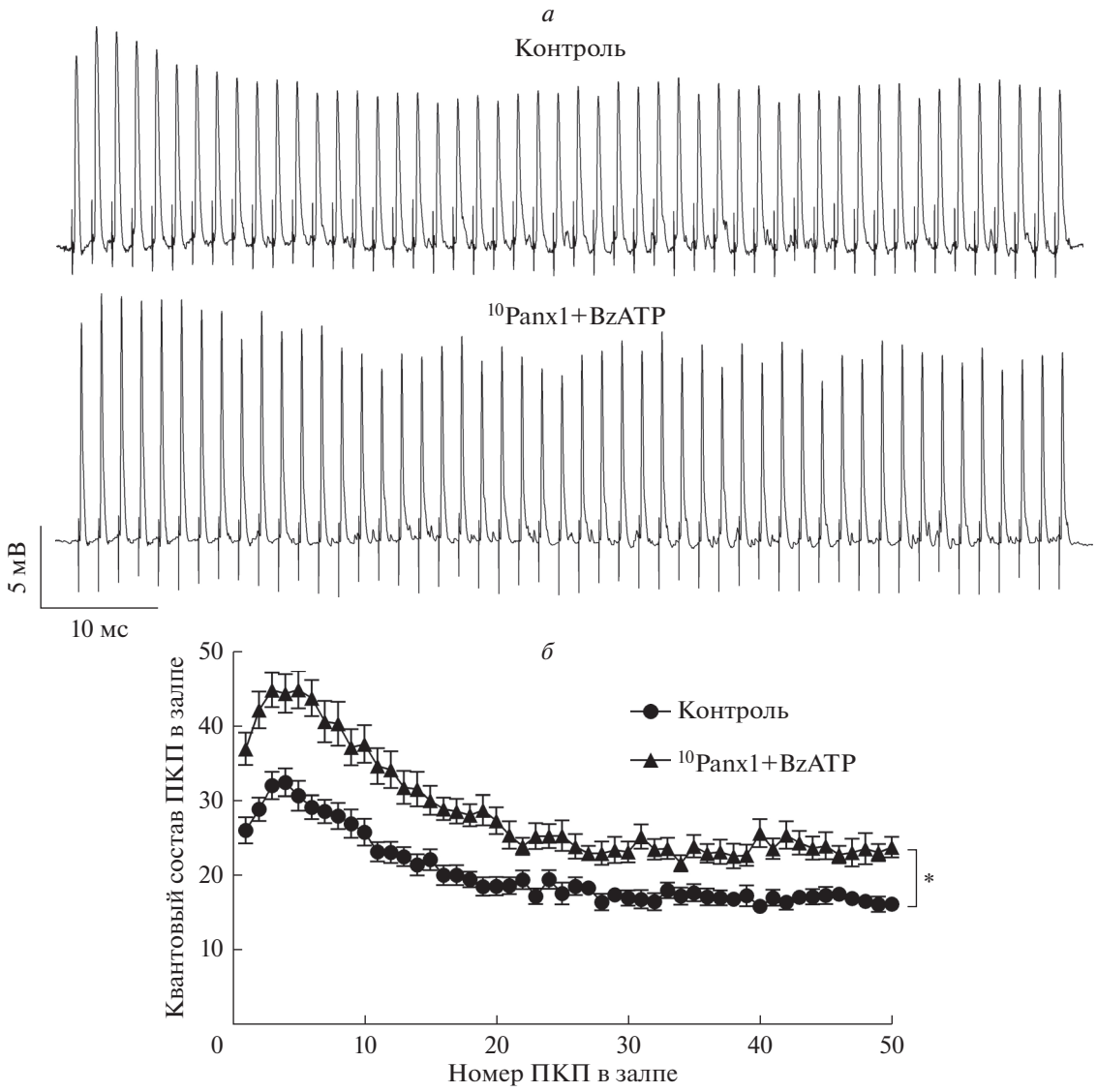

Рис. 3. Влияние аппликации агониста $P2X_7$-рецепторов на фоне блокады паннексина 1 при помощи ^{10}Panx1: *а* – примеры оригинальных записей ПКП в контроле и на фоне 10 мкМ ^{10}Panx1 совместно с 30 мкМ BzATP; *б* – изменение квантового состава ПКП по ходу залпа ПКП в контроле ($n = 18$) и на фоне 10 мкМ ^{10}Panx1 совместно с 30 мкМ BzATP ($n = 16$) в нервно-мышечных препаратах диафрагмы WT мышей. *$p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Одинаковые изменения проявлялись, в частности, в характере активации $P2X_7$-рецепторов при обоих типах выключения паннексинов и паннексинового источника ATP. $P2X_7$-рецепторы известны своей способностью обеспечивать вход Ca^{2+} в моторные терминали при их активации [26], но в то же время характеризуются как неактивные, обычно не вовлекаемые в пуринергическую регуляцию секреции АХ в моторных синапсах при их ритмической работе [5, 6]. Мы впервые установили, что при остром выключении паннексинов так же, как и при нокаутировании их гена, появляется одинаковая возможность, активируя $P2X_7$-пуринорецепторы их экзогенным агонистом BzATP, вызывать усиление секреции АХ в виде увеличения квантового состава ПКП. Этого не удается достичь у WT синапсов с сохраненной активностью паннексинов. При этом наши расчеты показали, что при обоих способах блокады паннексинов облегчение вызванной квантовой секреции АХ, индуцируемое активацией $P2X_7$-рецепторов, связано с увеличением размера пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу. Следовательно, любой способ выключения “паннексинового” источника ATP приводит к одинаковому изменению активности $P2X_7$-рецепторов – их способности потенцировать быструю синхронную квантовую секрецию АХ по сходному в обоих случаях механизму. По-

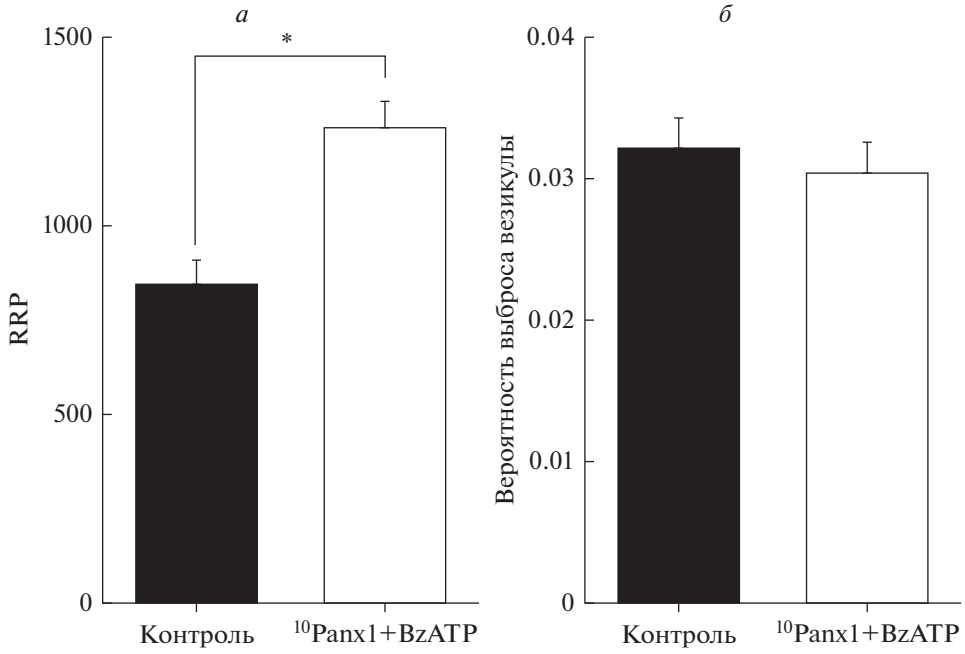

Рис. 4. Сопоставление размеров пула синаптических везикул, готовых к выбросу (RRP) в контроле и на фоне 1 мМ ^{10}Panx1 совместно с 30 мкМ BzATP (*а*); вероятности выброса везикул в контроле и на фоне 1 мМ ^{10}Panx1 совместно с 30 мкМ BzATP (*б*) в нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышей WT. *$p < 0.05$ по сравнению с контролем.

лученные данные означают также, что “паннексиновые” источники эндогенной ATP активно вовлечены в регуляцию передачи в моторных синапсах, оказывая определенное регуляторное воздействие на нее. Выключение этих источников отражается на регуляторной активности пуринорецепторов, в частности, пресинаптических $P2X_7$-рецепторов. Это согласуется с данными наших предыдущих исследований, где в моторных синапсах Panx1$^{-/-}$ мышей наблюдали сохранение активности разных типов пресинаптических пуринорецепторов, однако условия их избирательной активации эндогенными и экзогенными пуринами и вовлечения их в пуринергическую регуляцию секреции АХ оказывались измененными [5, 6].

Принято считать, что основным источником эндогенной ATP для пуринергической регуляции секреции АХ в моторных синапсах является везикулярная ATP, высвобождаемая в качестве комедиатора из холинергических везикул при их экзоцитозе [27]. Однако и в ЦНС, и на периферии в составе мембран скелетной мускулатуры [3], Шванновских клеток [22], моторных аксонов [28] показано присутствие паннексинов и наличие образованных ими каналов для высвобождения внутриклеточной ATP в среду, окружающую клетки [1]. Играет ли такой выход ATP роль ее тонической утечки, обеспечивая реализацию долговременных эффектов ATP в синапсах, или он может быть включен в пуринергическую кратковременную регуляцию синаптической активности, остается практически не изученным. Мы впервые показали, что достаточно выключить активность паннексинов у мышей за счет фармакологического ингибирования в остром опыте или путем нокаута гена паннексина 1, что равным образом изменяет характер и интенсивность активации пресинаптических пуринорецепторов в моторных синапсах, в частности $P2X_7$-рецепторов. Это доказывает вклад активности паннексинов и “паннексиновых” источников ATP в краткосрочную пуринергическую регуляцию секреции АХ наряду с везикулярной ATP. Какой именно из внутриклеточных источников ATP (мышечный, глиальный, аксональный) играет роль дополнительного “паннексинового” компонента пуриновой регуляции секреции АХ, и каким именно образом он включен в эту регуляцию, предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

В заключение подчеркнем, что в данной работе впервые сопоставлены эффекты генетического нокаутирования и острого фармакологического блокирования паннексина 1 в моторных синапсах для оценки роли именно “паннексинового” источника ATP в пуринергическую регуляцию секреции АХ. Полученные данные позволяют утверждать, что последствия в отношении синаптической передачи при генетическом или фармакологическом выключении паннексинов совпадают. В обоих случаях ключевым моментом является отсутствие активности паннексинов как

проводников ATP в область нервно-мышечных синапсов, одинаково отражающееся на пуринергической регуляции секреции АХ. Тем самым доказана возможность использования обоих методов как равноэффективных и правомочных для анализа механизмов участия паннексинов 1 и высвобождаемой с их помощью эндогенной ATP в регуляции секреции АХ нервно-мышечных синапсов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300071-8. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00189.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dahl G. 2015. ATP release through pannexon channels. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol Sci.* **370** (1672), 20140191. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191
2. Giaume C., Leybaert L., Naus C.C., Sáez J.C. 2013. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Front. Pharmacol.* **4**, 88. https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00088
3. Riquelme M.A., Cea L.A., Vega J.L., Boric, M.P., Monyer H., Bennett M.V.L., Frank M., Willecke K., Sáez J.C. 2013. The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels. *Neuropharmacol.* **75**, 594–603. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.022
4. Dossi E., Blauwblomme T., Moulard J., Chever O., Vasile F., Guinard E., Le Bert M., Couillin I., Pallud J., Capelle L., Huberfeld G., Rouachn N. 2018. Pannexin-1 channels contribute to seizure generation in human epileptic brain tissue and in a mouse model of epilepsy. *Sci. Transl. Med.* **10** (433), eaar3796. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar3796
5. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. 2017. The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A. Membr. Cell Biol.* **11** (4), 311–320. https://doi.org/10.1134/S1990747817040067
6. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. 2018. Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic. Signal.* **14** (4), 459–469.
7. Dvoriantchikova G., Ivanov D., Barakat D., Grinberg A., Wen R., Slepak V.Z., Shestopalov V.I. 2012. Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PloS One*. **7** (2), e31991. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031991
8. Тарасова Е.О., Митева А.С., Гайдуков А.Е., Балезина О.П. 2015. Роль аденозиновых рецепторов и кальциевых каналов L-типа в регуляции секреции медиатора в моторных синапсах мыши. *Биол. мембраны*. **32** (5–6), 409–409. https://doi.org/10.7868/S0233475515050151
9. McLachlan E.M., Martin A.R. 1981. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol.* **311** (1), 307–324.
10. Elmqvist D., Quastel D.M. 1965. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J. Physiol.* **178** (3), 505–529. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1965.sp007639
11. Ruiz R., Cano R., Casañas J.J., Gaffield M.A., Betz W.J., Tabares L. 2011. Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J. Neurosci.* **31** (6), 2000–2008. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011
12. Cano R., Ruiz R., Shen C., Tabares L., Betz W.J. 2012. The functional landscape of a presynaptic nerve terminal. *Cell calcium*. **52** (3–4), 321–326. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.012
13. Deuchars S.A., Atkinson L., Brooke R.E., Musa H., Milligan C.J., Batten T.F., Deuchars J. 2001. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* **21** (18), 7143–7152.
14. Young M.T., Pelegrin P., Surprenant A. 2007. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol. Pharmacol.* **71** (1), 92–100. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052
15. Savio L.E., de Andrade Mello P., da Silva C.G., Coutinho-Silva R. 2018. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? *Front. Pharmacol.* **9**, 52.
16. Gajardo I., Salazar C.S., Lopez-Espíndola D., Estay C., Flores-Muñoz C., Elgueta C., Gonzalez-Jamett A.M., Martínez A.D., Muñoz P., Ardiles Á.O. 2018. Lack of pannexin 1 alters synaptic GluN2 subunit composition and spatial reversal learning in mice. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 114. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00114
17. Iglesias R., Spray D.C., Scemes E. 2010. Mefloquine blockade of pannexin1 currents: Resolution of a conflict. *Cell. Commun. Adhes.* **16** (5–6), 131–137. https://doi.org/10.3109/15419061003642618
18. Silverman W., Locovei S., Dahl G. 2008. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **295** (3), C761–C767. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008
19. McArdle J.J., Sellin L.C., Coakley K.M., Potian J.G., Quinones-Lopez M.C., Rosenfeld C.A., Sultatos L.G., Hognason K. 2005. Mefloquine inhibits cholinesterases at the mouse neuromuscular junction. *Neuropharmacology*. **49** (8), 1132–1139. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.06.011
20. Suadicani S.O., Iglesias R., Wang J., Dahl G., Spray D.C., Scemes E. 2012. ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*.

60 (7), 1106–1116.
https://doi.org/10.1002/glia.22338

21. Zhang Z., Lei Y., Yan C., Mei X., Jiang T., Ma Z., Wang Q. 2019. Probenecid relieves cerebral dysfunction of sepsis by inhibiting pannexin 1-dependent ATP release. *Inflammation*. **42** (3), 1082–1092.
https://doi.org/10.1007/s10753-019-00969-4

22. Wei Z.Y., Qu H.L., Dai Y.J., Wang Q., Ling Z.M., Su W., Zhao Y.Y., Shen W.X., Chen G. 2021. Pannexin 1, a large-pore membrane channel, contributes to hypotonicity-induced ATP release in Schwann cells. *Neural. Regen. Res.* **16** (5), 899.
https://doi.org/10.4103/1673-5374.290911

23. He H., LiuD., Long Y., Wang X., Yao B. 2018. The pannexin-1 channel inhibitor probenecid attenuates skeletal muscle cellular energy crisis and histopathological injury in a rabbit endotoxemia model. *Inflammation*. **41** (6), 2030–2040.
https://doi.org/10.1007/s10753-018-0846-z

24. Prochnow N., Abdulazim A., Kurtenbach S., Wildförster V., Dvoriantchikova G., Hanske J., Zoidl G. 2012. Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning. *PloS One*. **7** (12), e51767.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051767

25. Ardiles A.O., Flores-Muñoz C., Toro-Ayala G., Cárdenas A.M., Palacios A.G., Muñoz P., Fuenzalida M., Sáez J.C., Martínez A.D. 2014. Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 326.
https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00326

26. Moores T.S., Hasdemir B., Vega-Riveroll L., Deuchars J., Parson S.H. 2005. Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction. *Brain Res.* **1034** (1–2), 40–50.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.001

27. Redman R.S., Silinsky E.M. 1994 ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J. Physiol.* **477**, 117–127.
https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020176

28. Horton S.M., Luna Lopez C., Blevins E., Howarth H., Weisberg J., Shestopalov V.I., Makarenkova H.P., Shah S.B. 2017. Pannexin 1 modulates axonal growth in mouse peripheral nerves. *Front. Cell Neurosci.* **11**, 365.
https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00365

Acetylcholine Secretion in Mouse Motor Synapses. Changes of Purinergic Regulation in the Conditions of Pharmacological Blockade of Pannexin 1 and Its Genetic Knockout

A. S. Miteva[1, *], A. E. Gaydukov[1], O. P. Balezina[1]

[1]*Biology Department, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: anka.miteva@gmail.com*

At the motor synapses of the mouse diaphragm, the effects on the acetylcholine (ACh) release of acute blockade of pannexin 1 (induced by pharmacological agents probenecid, mefloquine, or ^{10}Panx1) and the absence of its expression due to due to the gene knockout were compared. Pannexins 1 form a channel that can deliver ATP into the synaptic cleft, thereby affecting neuromuscular transmission. Using neuromuscular preparations from wild type mice, miniature endplate potentials (MEPPs) and endplate evoked potentials (EPPs) were recorded on exposure of various pannexin 1 blockers and the agonist of $P2X_7$ receptors (BzATP). The obtained results were compared with those obtained in the experiments performed on synapses of pannexin-1 knockout mice. Lack of pannexin 1 expression in knockout mice and its acute blocking by pharmacological agents (probenecid and ^{10}Panx1) in wild-type mice do not affect ACh release by themselves. However, the lack or blockade of pannexin 1 allows the agonist of $P2X_7$ receptors to potentiate neuromuscular transmission, which does not manifest without the blockade of pannexin 1. Moreover, in both cases, the potentiation of ACh release occurs due to an increase in the size of the readily releasable pool of cholinergic vesicles. On the basis of these observations we conclude that knockout or acute blocking of pannexin 1 equally affects the ACh release decreasing the purines concentration in the synaptic cleft. It is likely that the mechanisms underlying these effects are similar. They involve pannexin 1 as an important contributor in the purinergic regulation of the motor synapse activity: when it is lost or blocked, the conditions for the activation of presynaptic purinoreceptors change significantly.

Keywords: neuromuscular junction, pannexin 1, $P2X_7$-receptors, probenecid, ^{10}Panx1, readily releasable pool of vesicles

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 450–463

УДК 616-06

НАРУШЕНИЕ ДЕФОРМАЦИОННЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С V СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

© 2021 г. Ю. С. Судницына[a, b, *, #], Е. А. Скверчинская[b, #], И. М. Зубина[c], Е. Д. Суглобова[c], Т. Д. Власов[c], А. В. Смирнов[c], А. Н. Васильев[c], Т. О. Ружникова[b], Б. А. Калюжный[b], И. В. Миндукшев[b], Ю. А. Борисов[c]

[a] *Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 119991 Россия*

[b] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия*

[c] *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 197022 Россия*

**e-mail: julia.sudnitsyna@gmail.com*

[#] *Равный вклад*

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.
После доработки 03.06.2021 г.
Принята к публикации 04.06.2021 г.

Терминальная стадия хронической болезни почек (ХБП V) сопровождается рядом нарушений эритрона, в том числе структурными и функциональными изменениями циркулирующих эритроцитов, потенциально дестабилизирующими их функции и приводящими к различной степени анемии, однако механизмы этих явлений недостаточно изучены. В представленной работе методами проточной цитометрии, лазерной дифракции и спектрофотометрии мы исследовали влияние ХБП V и сеанса четырехчасового экстракорпорального гемодиализа (ГД) на деформационные (осмотическая и аммонийная резистентность) и функциональные (активность внутриклеточных эстераз, экстернализация фосфатидилсерина, состояние гемоглобина) показатели эритроцитов. Мы показали, что (i) эритроциты пациентов ГД имели сниженную осмотическую резистентность и повышенную скорость увеличения объема в аммонийном стресс-тесте по сравнению с клетками доноров; (ii) сеанс ГД не влиял на деформационные характеристики эритроцитов, однако приводил к (iii) образованию феррильных форм гемоглобина и (iiii) возникновению таких апоптоз-подобных явлений, как снижение активности внутриклеточных эстераз и повышение количества аннексин-позитивных клеток. Наши результаты указывают на то, что совокупность воздействия уремии и ГД терапии вызывает мультифакторное снижение функций эритроцитов пациентов ГД и играет важную роль в развитии и усугублении почечной анемии.

Ключевые слова: эритроциты, ХБП V, хроническая болезнь почек, окислительный стресс, аммонийный стресс, осмотическая резистентность эритроцитов

DOI: 10.31857/S0233475521060116

ВВЕДЕНИЕ

Терминальная стадия хронической болезни почек (ХБП V) вызывает множество дестабилизирующих гомеостаз и существенно снижающих качество жизни изменений в организме человека [1, 2], при этом сопутствующие ХБП V сердечно-сосудистые заболевания представляют основную причину смерти пациентов, достигая 50% от общего количества смертей вызываемых ХБП V [3]. К типичным серьезным осложнениям ХБП V относят нарушение эритропоэза, сниженную продукцию эритропоэтина и/или супрессию чувствительности рецепторов к эритропоэтину [4], дефицит железа, сокращение жизненного цикла эритроцитов и, как следствие, развитие почечной анемии [5]. Сокращение жизненного цикла эритроцитов пациентов отделения гемодиализа (ГД) может быть вызвано как воздействием уремических токсинов (*n*-крезилсульфат, метилглиоксаль, акролеин, индоксил сульфат и др.) [1, 2], приводящим в том числе к экстернализации фосфатидилсерина (ФС) на поверхности эритроцитов, гиперосмоляльностью плазмы [6], увеличением содержания промежуточных моноцитов

$CD14^{++}/CD16^{+}$, фагоцитирующих апоптотические эритроциты [4], окислительным стрессом (ОС) и энергетическим истощением, так и быть следствием лечения хроническим ГД [7]. В условиях уремии наблюдаются различные структурные и функциональные нарушения эритроцитов, такие как сниженная антиоксидантная активность [8, 9], повышенные адгезионная способность к эндотелию и прокоагулянтная активность [10, 11], нарушение асимметрии бислоя [12] и белкового состава плазматической мембраны [13, 14], т.е. факторы, потенциально дестабилизирующие основную функцию эритроцитов – транспорт дыхательных газов, однако механизмы развития перечисленных нарушений изучены не в полной мере.

Вязко-эластичные свойства (деформируемость) эритроцита, т.е. способность клетки к обратимым деформациям, зависят не только от общих условий циркуляции: геометрии сосуда, давления крови, вязкости, гематокрита и температуры, но во многом от биомеханических и биохимических характеристик эритроцита [15–17]. Снижение деформируемости может приводить к нарушению микроциркуляции, гемолизу внутри капилляров и преждевременной элиминации эритроцитов ретикуло-эндотелиальной системой [18, 19] и, следовательно, иметь важное значение в прогрессии анемии. В процессе лечения программным ГД кровь пациента подвергается физическому и химическому воздействию в экстракорпоральном круге кровообращения на протяжении длительного времени [20–23], что также может приводить к нарушению деформируемости и снижению срока жизни эритроцитов и способствовать развитию анемии. Таким образом, сама процедура ГД также может участвовать в усугублении почечной анемии.

Детальное изучение свойств эритроцитов и механизмов воздействия на них травмирующих факторов имеет важное значение для создания и коррекции схем лечения анемии различной этиологии. В настоящее время существует ряд методов анализа деформационных характеристик эритроцитов, оценивающих как биомеханические, так и биохимические свойства эритроцита. Используемые методы можно разделить на два типа: анализирующие одиночные клетки (оптический пинцет, голотомография и др.) или ансамбль клеток (эктацитометрия, фильтрационный тест и др.) [15, 24, 25], однако их использование сопряжено с трудоемкостью, высокой стоимостью оборудования и необходимостью специального обучения персонала. Несмотря на множество разработанных методов все еще не создан унифицированный протокол оценки деформируемости эритроцитов. В связи с этим разработка простого, универсального метода является актуальной задачей.

В представленной работе методами проточной цитометрии, лазерной дифракции и спектрофотометрии мы исследовали влияние ХБП V и сеанса 4-часового экстракорпорального ГД на деформационные (осмотическая и аммонийная резистентность) и функциональные (активность внутриклеточных эстераз, экстернализация ФС, состояние гемоглобина) показатели эритроцитов. Эритроциты пациентов отделения хронического ГД характеризовались повышенной скоростью увеличения объема в аммонийном стресс-тесте и сниженной осмотической резистентностью по сравнению с клетками доноров. Сеанс ГД не влиял на деформационные характеристики эритроцитов, однако приводил к образованию феррильных форм гемоглобина и возникновению апоптоз-подобных явлений, таких как снижение активности внутриклеточных эстераз и повышение количества аннексин-позитивных клеток. Наши результаты указывают на то, что воздействие уремии и ГД-терапии в совокупности вызывает мультифакторное снижение функций эритроцитов пациентов ГД и играет важную роль в развитии и усугублении нефрогенной анемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследовали свойства эритроцитов 15 человек без ренальной патологии – “доноры” (42 ± 16 лет) и 10 пациентов отделения хронического гемодиализа (от 11 до 120 месяцев на лечении ХГД, 47 ± 13 лет) НИИ Нефрологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова до и после ГД сессии. Группа пациентов состояла из больных с ХБП V, получающих лечение программным ГД, из них 7 мужчин и 3 женщины; причиной развития ХБП V в четырех случаях была мембранозная нефропатия, у трех больных был диагностирован хронический гломерулонефрит, у двоих отмечался нефросклероз, у одного больного был диагностирован гидронефроз. Проведение всех процедур было одобрено этическим комитетом ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова (протокол № 217 от 17.01.2020), этическим комитетом ИЭФБ РАН (протокол № 2–02 от 02.02.2021) и соответствовало декларации Хельсинки.

Реактивы. В экспериментах использованы следующие реактивы (конечная концентрация в клеточной суспензии или в рабочей среде): кальцеин-AM, 0.1 мкМ (Sigma–Aldrich, США), аннексин-V-FITC, 0.1 мкг/мл (Biolegend, США), тиазоловый оранжевый, 0.4 мкг/мл (Sigma–Aldrich). Для работы с эритроцитами человека были использованы: среда № 1 – HEPES буфер (в мМ: NaCl 140, KCl 5, HEPES 10, $MgCl_2$ 2, *D*-глюкоза 5, EGTA 2; pH 7.4, осмоляльность 300 мОсм/л) и среда № 2 – NH_4^+-буфер (в мМ: NH_4Cl 140, KCl 5, HEPES 10, $MgCl_2$ 2, *D*-глюкоза 5, EGTA 2; pH 7.4,

осмолярность 300 мОсм/л) при аммонийной нагрузке. Осмоляльность среды контролировали осмометром Osmomat 030 (Gonotec, Германия). В HEPES-буфер добавляли 2 мМ Ca^{2+} вместо 2 мМ EGTA, где отмечено.

Подготовка суспензии эритроцитов. Кровь доноров и пациентов после подписания ими письменного согласия отбирали в вакутейнеры с EDTA в качестве антикоагулянта. Эритроциты получали центрифугированием цельной крови (7 мин, 350 *g*), и ресуспендировали в HEPES буфере (RBC = 0.5×10^9 кл/мл, HCT 5%). Основные параметры крови и суспензии эритроцитов (концентрация эритроцитов – RBC, средний объем эритроцитов – MCV и т.д.) определяли с помощью гематологического анализатора Medonic-M20 (Boule Medical A.B., Швеция). Биохимический анализ крови и анализ содержания электролитов были выполнены в ЦКДЛ ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Исследования методом проточной цитометрии. Экстернализацию фосфатидилсерина и активность внутриклеточных эстераз регистрировали на проточном цитометре ЦКП ИЭФБ РАН – CytoFlex (BeckmanCoulter, США).

Определение экстернализации фосфатидилсерина. Экстернализацию ФС определяли с помощью ФС-специфичного лиганда аннексина-V–FITC. Аннексин-V является Ca^{2+}-зависимым красителем, поэтому для аннексинового теста в HEPES-буфер вместо EGTA добавляли кальций (2 мМ). Эритроциты (0.5×10^9 кл/л) инкубировали с аннексином-V (0.1 мкг/мл, 20 мин, в темноте, 25°C). ФС-позитивные клетки определяли по флуоресценции аннексин-V на канале FL1 (530 нм, FITC). Для каждого образца были проанализированы не менее 10000 событий. Гейт для негативного контроля выставляли по флуоресценции не связывающих аннексин-V эритроцитов здоровых доноров.

Исследование активности внутриклеточных эстераз. Эстеразную активность клеток оценивали по интенсивности флуоресценции кальцеина [26]. Эритроциты (0.5×10^9 кл/л) инкубировали с кальцеином-AM (C-AM, 5 мкМ, 40 мин, 37°C), флуоресценцию регистрировали в канале FL1 (530 нм, FITC).

Анализ количества ретикулоцитов. Содержание ретикулоцитов (RET%) определяли окраской тиазоловым оранжевым в цельной крови по методу Riley [27], для этого 5 мкл цельной крови ресуспендировали в 1 мл HEPES буфера с 10 мкл тиазолового оранжевого (конечная концентрация 0.4 мкМ, 20 мин). Популяцию эритроцитов определяли на диаграмме рассеяния (прямое рассеяние FSC против бокового рассеяния SSC) для исключения мелких частиц и тромбоцитов. Флуоресценцию тиазолового оранжевого регистрировали в канале FL1 (530 нм, FITC) при гейтировании положительной зеленой флуоресценции по сравнению с неокрашенным контролем, гейт выставляли по неокрашенной пробе каждого образца (blanc).

Исследование деформационных характеристик эритроцитов методом лазерной дифракции. Деформационные характеристики эритроцитов оценивали методом лазерной дифракции на анализаторе частиц LaSca-TM (ООО "Биомедицинские системы", Россия), адаптированном для цитологических исследований [28]. В основе метода – регистрация рассеянного излучения под разными углами с помощью многоэлементного детектора. По полученной зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния (индикатриса рассеяния) осуществляется расчет размеров частиц и распределения частиц по размерам, таким образом, в каждый момент времени считывается распределение всей популяции по объемам. Для оценки динамики изменения среднего объема клеток (MCV) использовали алгоритм оценки размеров частиц программного обеспечения LaSca_32 v.1498. В качестве стандартов использовали CML Latex beads 6, 10, 16 мкм (C37256, C37259, C37260, Invitrogen, США).

Стресс-модели. ***Аммонийный стресс-тест.*** В отличие от других клеток крови при помещении в изотоническую аммонийную среду эритроциты человека способны увеличивать объем до критических значений и лизировать. На основании этого уникального свойства эритроцитов нами был разработан оригинальный аммонийный стресс-тест для характеристики деформационно-функциональных свойств эритроцитов [29]. Для создания модели аммонийного стресса в 1 мл изотонического NH_4^+ буфера (37°C) вносили 5 мкл суспензии эритроцитов (RBC = 0.5×10^9 кл/мл, HCT 5%, конечная концентрация 5×10^5 кл/мл), регистрацию показателей светорассеяния проводили до окончания лизиса. Скорость увеличения объема клеток (V_i) оценивали по данным кинетики прямого светорассеяния в диапазоне угла 2.5°. Для количественного описания кинетики гемолиза использовали параметры T_{max} (время достижения максимальной скорости гемолиза) и V_{max} (максимальная скорость гемолиза) в диапазоне угла 1°.

Гипоосмотический стресс. Для проведения теста на осмотическую резистентность эритроциты (0.5×10^9 кл/мл, 5 мкл) вносили в 1 мл HEPES буфера с последующими добавками дистиллированной воды (dH_2O, мкл: 500, 500, 250, 250, 250, 250) и соответствующего объема эритроцитов для поддержания неизменной концентрации клеток в пробе. Лизис эритроцитов регистрировали методом лазерной дифракции по убыли интенсив-

ности светорассеяния в диапазоне угла 2.5°. Для каждого образца строили диаграммы распределения эритроцитов (эритрограммы) по осмотической резистентности в диапазоне осмоляльности от 300 до 92 мОсм/кг H_2O. Для количественного описания осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) использовали следующие параметры: H10, H50, H90, значения осмоляльности среды, при которой лизирует 10, 50 и 90% эритроцитов соответственно; W – ширина распределения клеток по осмотической резистентности, определяется разностью в осмоляльности среды при лизисе 90 и 10% эритроцитов [30].

Исследование форм гемоглобина спектральным методом. Спектры поглощения гемоглобина регистрировали спектрофотометром СПЕКС ССП-715-М (ООО "Спектроскопические системы", РФ) в ряду длин волн 300–700 нм с шагом 1 нм (25°C). Для исследования трансформации гемоглобина, цельную кровь лизировали в дистиллированной воде и регистрировали спектры поглощения.

Анализ содержания свободного гемоглобина в плазме. Свободный гемоглобин определяли в плазме, полученной центрифугированием цельной крови (7 мин, 350*g*) и разведенной в 20 раз дистиллированной водой. Расчет проводили по значениям оптической плотности раствора плазмы при 540 нм, оптическую плотность лизата цельной крови (разведение в 100 раз; Total) принимали за 100%. Для корректной оценки учитывали мутность растворов по оптической плотности при 700 нм по следующей формуле: Hb free, % = = ((Plasma540 – Plasma700) × 100)/((Total540 – – Total700)/5), где 540 и 700 – соответствующая длина волны, нм; 5 – поправка на разведение проб. Для пересчета свободного гемоглобина в плазме из % в г/л как 100% использовали значения концентрации гемоглобина (HGB), полученные на гематологическом анализаторе.

Расчет форм гемоглобина. Сравнительный анализ спонтанного образования окисленных форм гемоглобина проводили по экстинкции гемолизатов проб при длинах волн 560, 577, 630 и 700 нм. Процент окисленного гемоглобина рассчитывался по коэффициентам молярной экстинкции производных форм гемоглобина: oxyHb ($HbFe(II)O_2$), мет-Hb или ферри-Hb (ferric Hb, HbFe(III)), феррил-Hb (ferryl Hb, HbFe(IV)) или гемихром (HbChr) по методу Kanias [31]. Данные представлены как процент от суммы всех форм гемоглобина в образце, принятой за 100%.

Анализ данных. Данные, полученные методом проточной цитометрии, анализировали с использованием программ CytExpert (BeckmanCoulter, США) и FCS Express Flow 7 (De Novo Software, США). Время достижения максимальной скорости гемолиза (T_{hem}), максимальную скорость гемолиза (V_{hem}) и начальную скорость увеличения объема клеток (V_i) рассчитывали с использованием оригинальной программы лазерного анализатора LaSca-TM – LaSca v.1498. Статистическую значимость результатов определяли с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Оценку нормальности проводили тестом Шапиро–Уилки, разницу между группами оценивали one-way ANOVA с апостериорным анализом Тьюки (доноры в сравнении с пациентами) до/после ГД сессии), разницу между связанными группами оценивали *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок ("пациенты до" в сравнении с "пациентами после" сеанса ГД). Во всех экспериментах данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). В каждой серии экспериментов участвовали не менее десяти доноров. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эритроциты пациентов с ХБП V имеют повышенный объем несмотря на гиперосмоляльность плазмы. В условиях уремического синдрома у пациентов с ХБП V наблюдаются структурные и функциональные нарушения эритроцитов [18, 19]. Кроме того, срок жизни уремических эритроцитов снижен в среднем на 20%: до 73 дней при норме 100–120 дней [2, 12, 32]. Мы провели сравнение клинических и биохимических анализов крови доноров (в том числе референсных значений нормы по данным лаборатории Хеликс) и пациентов до и после ГД-сессии (табл. 1). У пациентов не было выявлено ни гипо/гипернатриемии, ни гипо/гипергликемии. Однако уремические токсины (креатинин, мочевина, мочевая кислота и др.) суммарно повышали измеренную осмоляльность плазмы до 330 ± 21 мОсм/л H_2O, вплоть до 380 мОсм/л H_2O в единичных случаях. Сеанс ГД снимал уремический синдром, однако показатель уровня мочевины превышал норму даже после ГД сессии. Тем не менее в условиях циклического гиперосмоляльного окружения эритроциты больных имели на 12% больший объем (MCV): 93.02 ± ± 2.77 фл у пациентов до и 93.23 ± 2.91 фл после ГД-сессии ($n = 10$, $p < 0.0001$) по сравнению с 82.75 ± 1.39 фл у доноров (рис. 1*а*).

Эритроциты пациентов как до, так и после сеанса ГД имели достоверно большее значение индекса гетерогенности по объему (RDWa) (рис. 1*б*), что указывает на наличие воспаления и/или его прогрессию [33]. Анализ ретикулоцитов (RET) не выявил достоверных различий в абсолютном значении, однако наблюдалось достоверное увеличение процента молодых ретикулоцитов (RET-H) с большим содержанием РНК (рис. 1*в*) у пациентов ХГД по сравнению с донорами.

Таблица 1. Показатели клинического и биохимического анализа крови доноров с референсными значениями нормы и пациентов до и после сеанса ГД. Данные представлены как $M \pm$ SD

Группа	Возраст, годы	Время на ГД, мес.	Общий анализ крови				Осмолярность плазмы, мОсм/л H_2O	Глюкоза, мМ	Мочевая кислота, мкмоль/л	Креатинин, мМ/л	Мочевина, мМ/л	СРБ, мг/л	Электролит, мМ/л			
			RBC × $\times 10^{12}$, кл/л	HGB, г/л	PLT × $\times 10^{9}$, кл/л	WBC × $\times 10^{9}$, кл/л							натрий	фосфор	кальций	калий
Доноры	41.81 ± ± 15.53	–	3.99 ± ± 0.33	124.41 ± ± 5.89	198.01 ± ± 30.6	5.25 ± ± 1.17	296.01 ± ± 8.52	4.10–6.10	202.30–416.50	0.53–1.15	2.1–7.1	0–10	136–145	0.78–1.42	2.10–2.55	3.5–5.1
Пациенты до сеанса ГД ($n = 10$)	47.30 ± ± 13.26	57.10 ± ± 41.49	3.54 ± ± 0.35#	112.71 ± ± 8.47#	263.91 ± ± 92.12	8.78 ± ± 3.78##	329.81 ± ± 21.26##	5.379 ± ± 0.88	462.6 ± ± 76.24	0.99 ± ± 0.14	23.26 ± ± 5.65	6.27 ± ± 3.97	138.11 ± ± 3.22	2.45 ± ± 0.79	2.23 ± ± 0.25	5.41 ± ± 0.53
Пациенты после сеанса ГД ($n = 10$)			3.87 ± ± 0.46**	123.81 ± ± 13.17**	258.31 ± ± 77.28	7.62 ± ± 2.45	305.83 ± ± 13.73*	5.379 ± ± 0.88	100.56 ± ± 25.24***	0.40 ± ± 0.08****	7.68 ± ± 2.05****		138.9 ± ± 1.91	1.08 ± ± 0.18***	2.59 ± ± 0.16***	4.21 ± ± 0.41****

Примечание: RBC – количество эритроцитов, HGB – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, PLT – количество тромбоцитов, WBC – количество лейкоцитов; СРБ – С-реактивный белок. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, t-тест Стьюдента для связанных выборок – пациенты до ГД по сравнению с пациентами после ГД сессии. # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, ANOVA, апостериорный критерий Тьюки – доноры по сравнению с пациентами до ГД/после ГД-сессии. Серым выделены референсные значения нормы по стандартам лаборатории Хеликс.

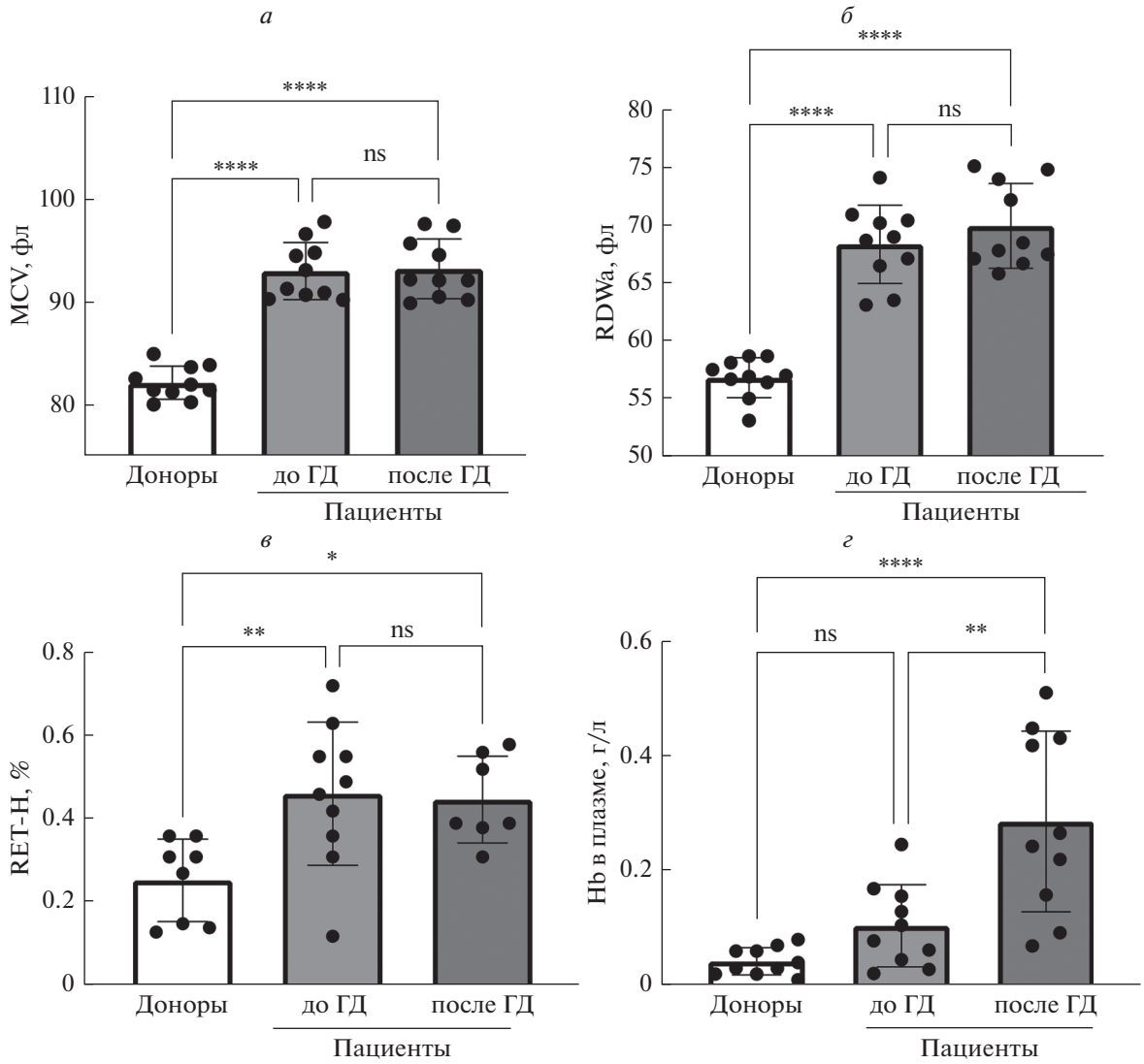

Рис. 1. Гематологический профиль пациентов с ХБП V в сравнении с донорами. У пациентов с ХБП V были отмечены: достоверное увеличение среднего объема эритроцитов (MCV) (*а*) и гетерогенности эритроцитов по объему (RDWa) (*б*), процента молодых ретикулоцитов с высокой флуоресценцией (RET-H) (*в*) и содержания свободного гемоглобина в плазме (Hb в плазме) (*г*). MCV и RDWa получали с помощью гематологического анализатора; RET-H – методом проточной цитометрии; содержание свободного Hb в плазме оценивали спектрально при длине волны 540 нм. Данные представлены как M ± SD, $n = 10$. Различия между показателями эритроцитов пациентов до и после ГД определяли *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок, ** $p < 0.005$; различия между показателями эритроцитов доноров и пациентов определяли с помощью ANOVA, апостериорный анализ Тьюки, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Уремический синдром, а не сеанс ГД, вызывает изменение деформационных характеристик эритроцитов. Структурная целостность сети цитоскелета – основной фактор, определяющий вязко-эластичные свойства эритроцита и его деформируемость [34, 35]. Ранее мы показали при 25°C, что сеанс ГД не влиял на функциональные характеристики эритроцитов пациентов [36]. Однако отсутствие различий могло быть вызвано снижением чувствительности эритроцитов к стрессорным воздействиям при 25°C. В этой работе для оценки влияния ГД-сессии на деформационные характеристики эритроцитов были проведены тест на осмотическую резистентность эритроцитов (рис. 2*а*–2*г*) и аммонийный стресс-тест (рис. 3*а*–3*г*) при 37°C.

При исследовании осмотической резистентности не было выявлено значимых отличий между показателями эритроцитов пациентов до и после сеанса ГД, однако эритроциты пациентов были достоверно более хрупкими, чем эритроциты доноров (H10, H50, H90, $p < 0.05$).

При проведении аммонийного стресс-теста было выявлено, что скорость начального увели-

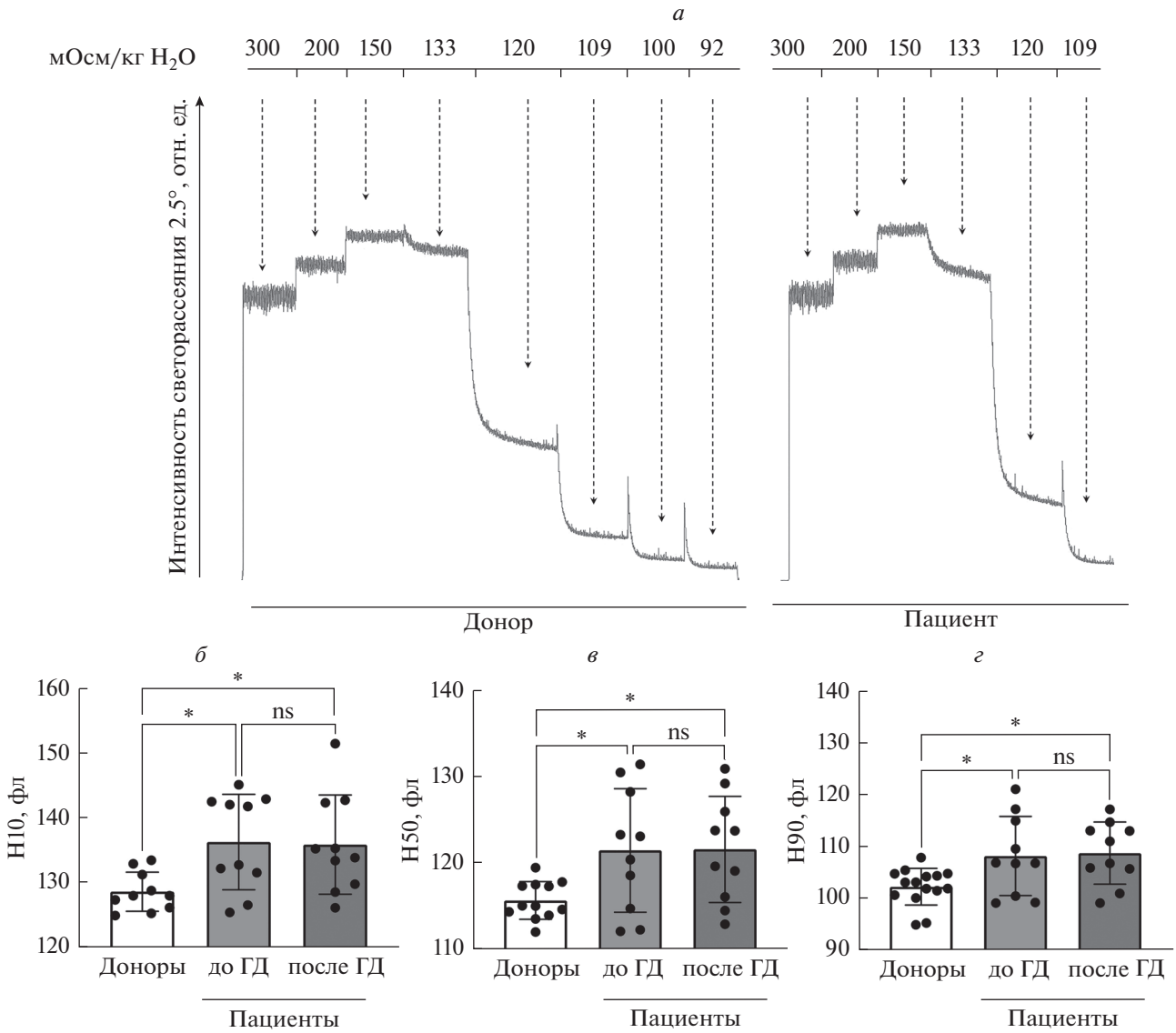

Рис. 2. Уремический синдром, а не сеанс ГД, приводит к снижению осмотической резистентности эритроцитов. *а* – Запись оригинальных экспериментов по исследованию осмотической резистентности эритроцитов доноров и пациентов методом лазерной дифракции. Эритроциты (0.5×10^9 кл/мл) вносили в 1 мл HEPES буфера с последующими добавками дистиллированной воды (dH_2O, мкл: 500, 500, 250, 250, 250, 250) и соответствующего объема эритроцитов для поддержания концентрации клеток в пробе. Гемолиз эритроцитов регистрировали по убыли интенсивности светорассеяния в диапазоне угла 2.5°. *б–г* – По интенсивности светорассеяния в диапазоне осмоляльности от 300 до 92 мОсм/кг H_2O строили кривые гемолиза, из которых получали значения осмоляльности, при которой лизировали 10% эритроцитов (H10) (*б*); 50% эритроцитов (H50) (*в*); 90% эритроцитов (H90) (*г*). Данные представлены как M ± SD, $n = 10$. Различия между показателями эритроцитов пациентов до и после ГД-сессии определяли *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок; различия между показателями эритроцитов доноров и пациентов определяли с помощью ANOVA, апостериорный анализ Тьюки, * $p < 0.05$.

чения объема эритроцитов (V_i) в аммонийной среде у доноров была достоверно ниже, чем у пациентов как до, так и после ГД ($p < 0.0001$ и $p < 0.05$ соответственно), что указывает на изменение функции белка полосы 3 в условиях уремии. Значимых различий в скорости (рис. 3*б*), времени (рис. 3*в*) и проценте гемолиза (рис. 3*г*) ни на протяжении ГД-сессии, ни при сравнении показателей доноров и пациентов до и после сеанса ГД не было выявлено.

Таким образом, полученные данные указывают на отсутствие значимого влияния сеанса ГД на деформационные характеристики эритроцитов, однако эритроциты доноров были достоверно более осмотически резистентными по сравнению с эритроцитами пациентов как до, так и после

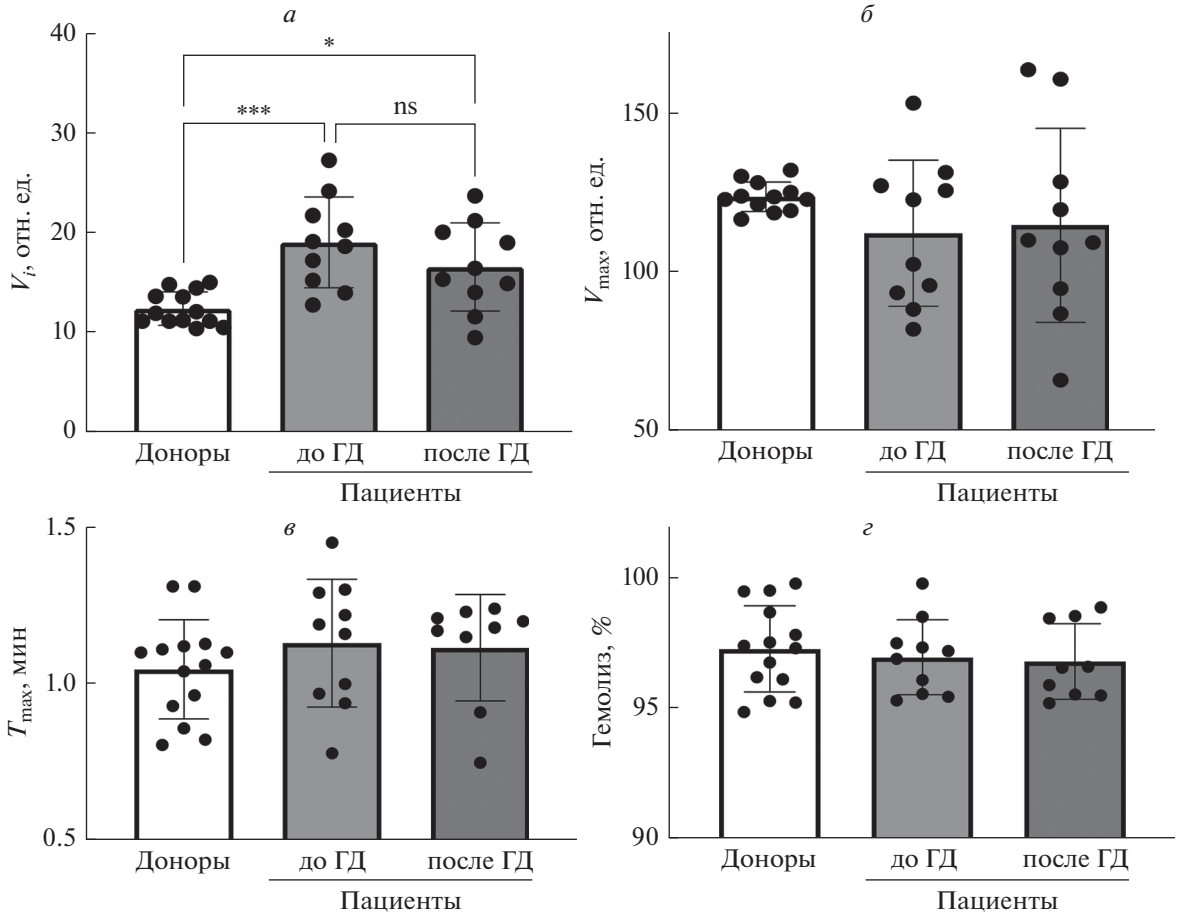

Рис. 3. Сеанс ГД не вызывает деформационных характеристик эритроцитов в аммонийном стресс-тесте. Эритроциты (10^6 кл/мл) помещали в изотонический NH_4^+ буфер (среда № 2, pH 7.4), методом лазерной дифракции регистрировали увеличение сигнала, соответствующее увеличению объема клеток, с последующим снижением сигнала, соответствующим гемолизу. Далее рассчитывались параметры аммонийного стресс-теста: *а* – скорость начального увеличения объема эритроцитов (V_i); *б* – максимальная скорость гемолиза (V_{max}); *в* – время достижения максимальной скорости гемолиза (T_{max}), *г* – процент гемолиза. Данные представлены как M ± SD, $n = 10$. Различия между показателями эритроцитов пациентов до и после ГД-сессии определяли *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок; различия между показателями эритроцитов доноров и пациентов определяли с помощью ANOVA, апостериорный анализ Тьюки, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

ГД-сессии, что говорит о повышенной хрупкости эритроцитов пациентов с ХБП V.

ГД вызывает увеличение образования феррильных форм гемоглобина. Осуществление основной функции эритроцита, газообмена, напрямую зависит от состояния гемоглобина, белка, обратимо связывающего и переносящего молекулы кислорода к тканям [37, 38]. Мы провели спектральный анализ образцов крови доноров и пациентов в ходе ГД-сессии (рис. 4*б*). Расчет процентного содержания форм гемоглобина в образцах выявил, что в ходе диализной сессии достоверно увеличивалось процентное содержание феррильных форм гемоглобина (рис. 4*а*), нестабильных форм гемоглобина, потенциально приводящих к деградации и потере гема [39, 40].

Сеанс ГД приводит к снижению активности внутриклеточных эстераз и экстернализации фосфатидилсерина в эритроцитах. Ранее (рис. 1*в*) мы показали, что сеанс ГД вызывал достоверное увеличение спонтанного гемолиза, однако анемия может быть вызвана также и преждевременной элиминацией эритроцитов. Поэтому мы проверили, как ГД-сессия влияет на активность внутриклеточных эстераз и экстернализацию ФС на поверхности эритроцитов. Оценку влияния уремического синдрома и/или ГД-сессии на жизнеспособность эритроцитов [26, 30] пациентов до и после сеанса ГД проводили по активности внутриклеточных эстераз с помощью красителя кальцеина-АМ (С-АМ) (рис. 5*а*, 5*б*). Было выявлено, что активность внутриклеточных эстераз в эрит-

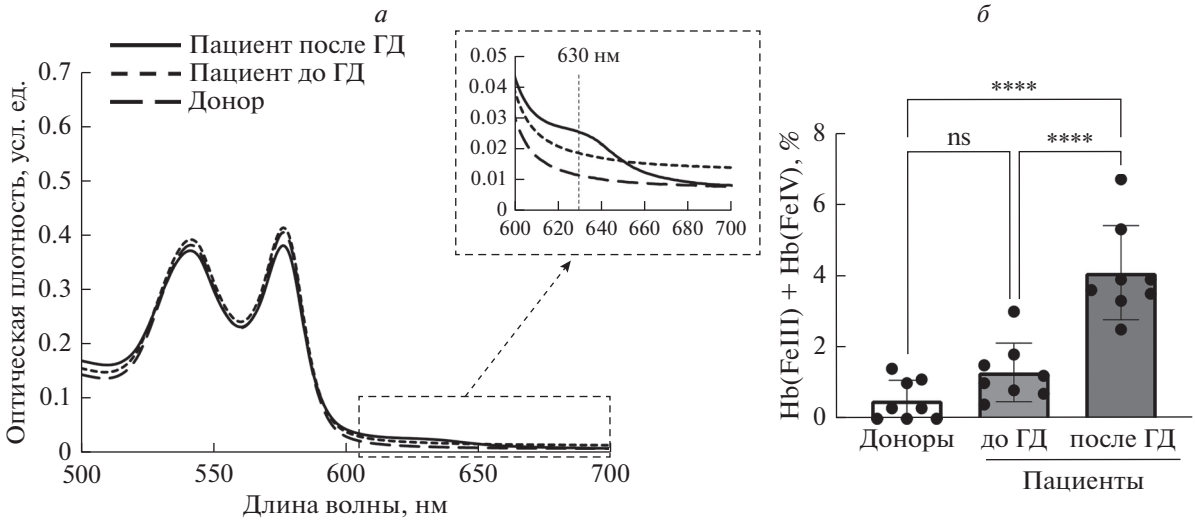

Рис. 4. Сеанс ГД приводит к увеличению % феррильных форм гемоглобина Hb(FeIII) и Hb(FeIV). *а* – Спектры поглощения гемоглобина доноров и пациентов до и после ГД-сессии. Эритроциты (1.25×10^7 кл/мл) доноров и пациентов до и после ГД-сессии гипоосмотически лизировали, сканировали спектры гемолизатов и проводили расчет форм гемоглобина по экстинкции проб при длинах волн 560, 577, 630 и 700 нм по методу Kanias [36]. *б* – Количественная оценка спонтанного образования окисленных форм гемоглобина по данным спектров поглощения гемоглобина доноров и пациентов до и после ГД-сессии. Данные представлены как $M \pm$ SD, $n = 10$. Различия между показателями эритроцитов пациентов до и после ГД определяли *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок, **** $p < 0.0001$; различия между показателями эритроцитов доноров и пациентов определяли с помощью ANOVA, апостериорный анализ Тьюки, **** $p < 0.0001$.

роцитах доноров достоверно выше ($n = 10$, $p < 0.0001$), чем у пациентов как до, так и после ГД-сессии. При этом сама ГД-сессия приводила к еще большему снижению эстеразной активности эритроцитов пациентов ($n = 10$, $p < 0.0001$).

Один из сигналов используемый макрофагами для элиминации старых или поврежденных эритроцитов – экстернализация ФС на поверхности. Поэтому мы проверили данный параметр с помощью теста на связывание аннексина-V (рис. 5*в*, 5*г*). Эритроциты пациентов после сеанса ГД характеризовались достоверно большим процентом аннексин-положительных клеток ($p < 0.005$) по сравнению с эритроцитами доноров, однако в ходе ГД-сессии не было выявлено достоверных отличий.

Таким образом, мы показали, что как сам уремический синдром, так и сеанс ГД вызывают изменения эритроцитов с маркерными признаками апоптоз-подобного сценария клеточной гибели: ингибирование эстеразной активности, экстернализация ФС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Структурная целостность сети цитоскелета определяет вязко-эластичные свойства эритроцита и его деформируемость [40, 41]. Изменение в экспрессии интегральных белков, маркеров адгезии и транспортных белков может стать причиной нарушения вязко-эластичных свойств эритроцита и молекулярных путей сигнализации в эритроцитах [3, 42]. Протеомным анализом было выявлено, что набор белков в цитоплазматической мембране эритроцитов пациентов, страдающих от уремического синдрома, значительно отличается от здоровых людей. В эритроцитах пациентов с ХБП V была отмечена сниженная экспрессия спектрина, белка полосы 3 (AE1), актина и CD47 (маркера, препятствующего фагоцитозу) [43], что, вероятно, вовлечено в патогенез нарушения способности эритроцитов к обратимым деформациям, выявленного у пациентов с терминальной стадией ХБП [3, 42].

В проведенном исследовании был использован метод лазерной дифракции для оценки деформационных характеристик эритроцитов. Были предложены оригинальные осмотический и аммонийный стресс-тесты, которые показали высокую эффективность в детекции осмотической резистентности эритроцитов и оценки реакции эритроцитов на аммонийный стресс. Аммонийным стресс-тестом мы показали, что скорость увеличения объема эритроцитов (V_i) у пациентов значимо выше, чем у здоровых доноров (рис. 3*а*). Этот показатель характеризует функцию белка полосы 3, основного структурного белка мембраны эритроцита, одной из важных функций которого также является поддержание внутриклеточного pH. По-видимому, уремический синдром дестабилизирует функцию этого белка, что также негативно сказывается как на деформационных,

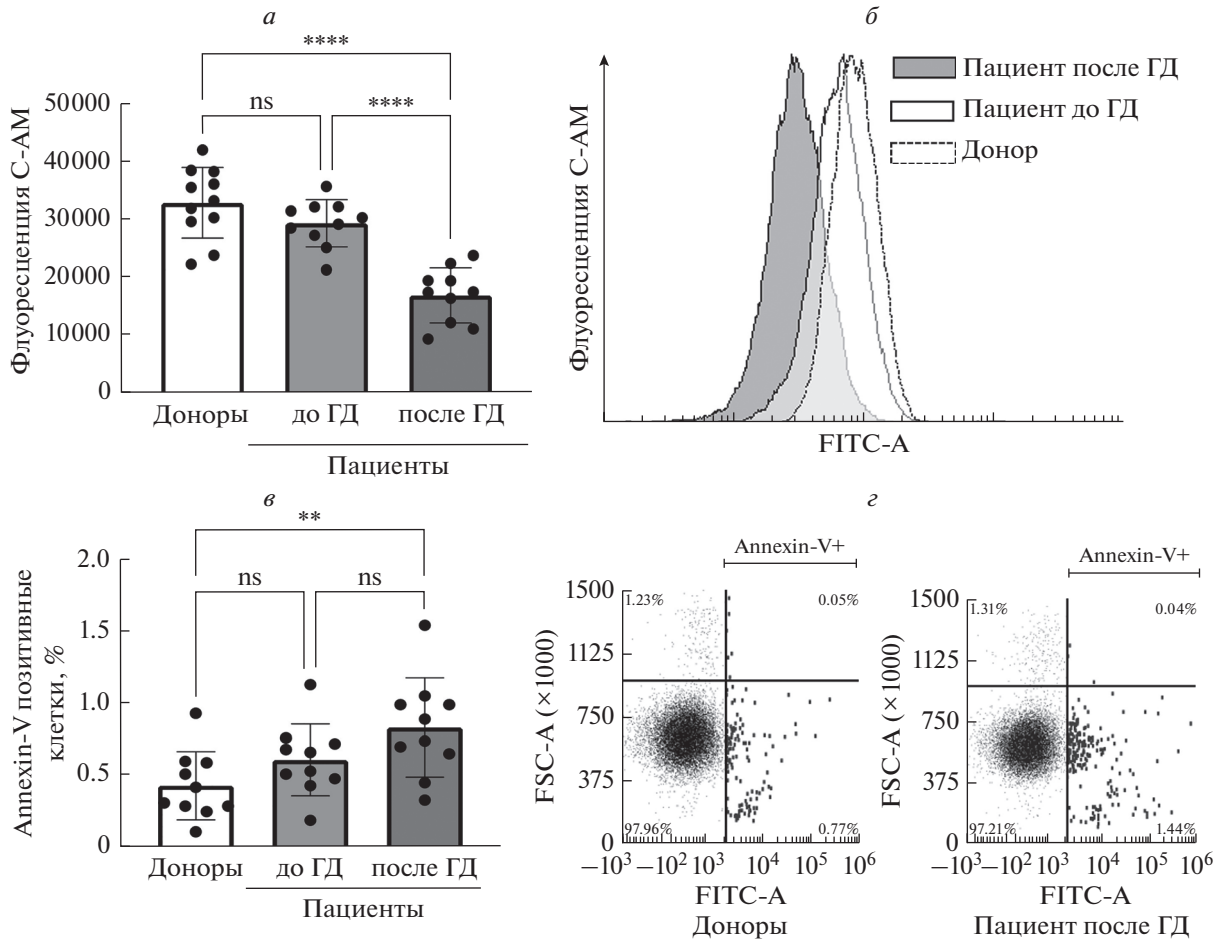

Рис. 5. Сеанс ГД приводит к снижению эстеразной активности и увеличению экстернализации ФС в эритроцитах пациентов ХГД. Эритроциты (0.5×10^9 кл/мл) инкубировали с кальцеином (C-AM, 0.1 мкг/мл, 20 мин, в темноте, 25°C) (*а*, *б*) или аннексином-V (5 мкМ, 40 мин, 37°C) (*в*, *г*). *а* – Количественная оценка активности внутриклеточных эстераз эритроцитов доноров и пациентов до и после сеанса ГД; *б* – репрезентативный эксперимент по исследованию активности внутриклеточных эстераз в эритроцитах методом проточной цитометрии; *в* – количественная оценка аннексин-положительных клеток среди эритроцитов доноров и пациентов до и после сеанса ГД; *г* – репрезентативные эксперименты по определению аннексин-положительных клеток среди эритроцитов доноров и пациентов после сеанса ГД, события в аннексин-положительном гейте эмфазированы с помощью программы FCS Express 7. Данные представлены как M ± SD, $n = 10$. Различия между показателями эритроцитов пациентов до и после ГД определяли *t*-тестом Стьюдента для связанных выборок, **** $p < 0.0001$; различия между показателями эритроцитов доноров и пациентов определяли с помощью ANOVA, апостериорный анализ Тьюки, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

так и функциональных характеристиках эритроцитов пациентов. Ранее было показано, что белок полосы 3 вовлечен в транспорт ряда уремических токсинов внутрь эритроцита [1, 44]. Таким образом, необходимо дальнейшее исследование роли белка полосы 3 в прогрессии деструктивных изменений мембраны и цитоскелета эритроцитов пациентов с ХБП V.

Гиперосмоляльность плазмы, вызванная повышением концентрации уремических токсинов [6], в совокупности с самим действием уремических токсинов [1, 44] может преждевременно запускать апоптоз эритроцитов [10, 11], также приводя к почечной анемии. Несмотря на высокую лабильность эритроцитов к деформациям и широким диапазонам осмоляльности, влияние циклического долговременного нахождения в гиперосмоляльной среде, как в случае больных с терминальной стадией ХБП, на транспортные характеристики эритроцитов недостаточно изучено. В норме в изоосмотической среде эритроциты человека представляют собой двояковогнутый диск, такая форма обеспечивает им высокое соотношение поверхности к объему и, соответственно, возможность подвергаться широкому диапазону объемных изменений и обратимых деформаций в циркуляции. В гипоосмотической среде эритроциты трансформируются в стоматоциты, увеличивая свой объем до 74%, а в гиперосмотической среде – трансформируются в эхино-

циты и сжимаются на 34% [41, 45]. Однако несмотря на цикличное нахождение в гиперосмоляльном окружении, средний объем эритроцитов пациентов как до, так и после сеанса ГД был на 13% выше по сравнению с донорами (рис. 1*а*). Также было выявлено, что эритроциты пациентов как до, так и после ГД сессии были менее осмотически резистентны по сравнению с эритроцитами доноров (рис. 2*а*–2*г*). Такое снижение ОРЭ может быть вызвано увеличенным средним объемом эритроцитов (рис. 1*а*), и, вероятно, является причиной отмеченного повышенного содержания свободного гемоглобина в плазме (рис. 1*в*). Таким образом, описанные изменения деформационных характеристик эритроцитов, по-видимому, являются одной из причин внутрисосудистого и внутрикапиллярного гемолиза, ассоциированного с ХБП V [43].

Уремические токсины не только влияют на функцию клетки извне, но и способны воздействовать изнутри, аккумулируясь внутри клетки [1, 44, 46]. В наших экспериментах в эритроцитах пациентов ХГД помимо сниженной осмотической резистентности (рис. 2) и изменения функции белка полосы 3 (рис. 3*а*) было отмечено повышенное образование феррильных форм гемоглобина (рис. 4), снижение эстеразной активности (рис. 5*а*, 5*б*) и повышение экстернализации ФС (рис. 5*в*, 5*г*) на поверхности эритроцитов, т.е. маркерных признаков апоптоза эритроцитов, ассоциированного со слабым окислительным стрессом [30]. ОС – один из важных факторов, приводящих к снижению срока жизни эритроцитов [47]. При ОС происходит окисление гемоглобина до мет-Hb или ферри-Hb (ferric Hb, HbFe(III)) и сверх-окисленных форм (феррил-Hb (ferryl Hb, HbFe(IV)) – гемихромов (HbChr) [39, 40], образование активных форм кислорода и последующее окисление белков, липидов и полиненасыщенных жирных кислот [48]. Описанные явления наряду с накоплением метаболитов также могут приводить к нарушению деформируемости эритроцита, так как при фосфорилировании белка полосы 3, сопровождающем ОС, происходит нарушение взаимодействия “белок полосы 3 – цитоскелет” [40], дестабилизирующее структуру и целостность мембраны и цитоскелета, и липидную асимметрию мембраны. Образование гемихромов в свою очередь индуцирует выход микрочастиц, содержащих окисленные формы Hb [30]. Описанные явления, вероятно, играют важную роль в прогрессии нарушения функций эритроцита и усугублении почечной анемии при ХБП V.

Уремический синдром оказывает негативное воздействие на продукцию и деструкцию эритроцитов, функцию лимфоцитов и тромбоцитов, а также на активацию коагуляционной системы [4]. У пациентов с ХБП V отмечается хроническое воспаление и повышенное содержание промежуточных моноцитов [4], которое также может играть роль в патогенезе почечной анемии. Совместно со снижением экспрессии CD47, маркера, противодействующего элиминации эритроцитов макрофагами [49], эти факторы могут усугублять анемический синдром. При сравнении клинического и биохимического анализов крови пациентов ГД и здоровых доноров (табл. 1) было выявлено достоверное повышение индекса гетерогенности эритроцитов по размеру (RDWa) (рис. 1*б*), что также указывает на наличие воспаления или его прогрессию [33], в то время как такой маркер системного острого воспаления, как С-реактивный белок (табл. 1), был в пределах нормы. После ГД-сессии наблюдалось достоверное увеличение концентрации эритроцитов по сравнению с показателями до сеанса ГД (табл. 1, рис. 1*а*), при этом концентрация тромбоцитов и лейкоцитов не менялась. Можно предположить, что в ходе сеанса ГД из селезенки высвобождается пул эритроцитов, однако эти данные требуют дальнейшей проверки.

Ранее мы показали, что эритроциты человека способны как транспортировать, так и импортировать аммоний/аммиак [29, 50], они экспрессируют аммонийный транспортер RhAG и, по-видимому, играют важную роль в поддержании аммонийного и/или азотистого баланса в организме. В связи с этим поддержание структурной целостности и пластичности мембраны и цитоскелета приобретают особенно важное значение в таких группах риска гипераммониемии, как пациенты отделения хронического гемодиализа (нарушение биохимического гомеостаза и постоянное химическое и механическое воздействие на клетки), взрослые с повышенной физической нагрузкой (неспособность организма справиться с избыточным потоком аммония/аммиака) и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на то, что у пациентов отделения хронического ГД уремическая интоксикация и цикличное нахождение эритроцитов в окружении гиперосмоляльной плазмы, а не сам сеанс ГД, вызывают нарушение деформационных характеристик эритроцитов, отчасти приводящее к анемическому синдрому. С другой стороны, сеанс ГД приводил к увеличению процента феррильных форм гемоглобина, снижению активности внутриклеточных эстераз и повышению экстернализации фосфатидилсерина на поверхности эритроцита, т.е. к образованию маркеров элиминации клеток макрофагами и ретикуло-эндотелиальной системой. Таким образом, мы показали, что совокупность воздействия уремии и ГД-сессии вызывает мультифакторное снижение деформируемости и функциональных показателей эритроцитов пациентов

отделения ГД и играет важную роль в развитии и усугублении почечной анемии. Дальнейшее исследование нарушения свойств эритроцитов позволит расширить понимание механизмов развития почечной анемии, ассоциированной с терминальной стадией ХБП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-60015 (ЮС) и ГЗ АААА-А18-118012290371-3 (ЮС, ЕС, ИМ).

Соответствие принципам этики. Проведение всех процедур было одобрено этическим комитетом ПСПБГМУ им. ак. И.П. Павлова (протокол № 217 от 17.01.2020), этическим комитетом ИЭФБ РАН (протокол № 2–02 от 02.02.2021) и соответствовало декларации Хельсинки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glassock R.J. 2008. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. *J. Ren. Nutr.* **18** (1), 2–6.
2. Vos F.E., Schollum J.B., Coulter C.V., Doyle T.C., Duffull S.B., Walker R.J. 2011.Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **58** (4), 591–598.
3. Kliche K., Gerth U., Pavenstädt H., Oberleithner H. 2015. Recharging red blood cell surface by hemodialysis. *Cell Physiol. Biochem*. **35** (3), 1107–1115.
4. Bonan N.B., Steiner T.M., Kuntsevich V., Virzì G.M., Azevedo M., Nakao L.S., Barreto F.C., Ronco C., Thijssen S., Kotanko P., Pecoits-Filho R., Moreno-Amaral A.N. 2016. Uremic toxicity-induced eryptosis and monocyte modulation: The erythrophagocytosis as a novel pathway to renal anemia. *Blood Purif.* **41** (4), 317–323.
5. Fishbane S., Spinowitz B. 2018. Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD: Core curriculum 2018. *Am. J. Kidney Dis.* **71** (3), 423–435.
6. Georgatzakou H.T., Tzounakas V.L., Kriebardis A.G., Velentzas A.D., Papageorgiou E.G., Voulgaridou A.I., Kokkalis A.C., Antonelou M.H., Papassideri I.S. 2017. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur. J. Haematol.* **98** (6), 590–600.
7. Tozoni S.S., Dias G.F., Bohnen G., Grobe N., Pecoits-Filho R., Kotanko P., Moreno-Amaral A.N. 2019. Uremia and hypoxia independently induce eryptosis and erythrocyte redox imbalance. *Cell Physiol. Biochem.* **53**, 794–804.
8. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, 360438.
9. Sindhu R.K., Ehdaie A., Farmand F., Dhaliwal K.K., Nguyen T., Zhan C.D., Roberts C.K., Vaziri N.D. 2005. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1743 (1–2), 86–92.
10. Gao C., Xie R., Yu C., Ma R., Dong W., Meng H., Zhang Y., Si Y., Zhang Z., Novakovic V., Zhang Y., Kou J., Bi Y., Li B., Xie R., Gilbert G.E., Zhou J., Shi J. 2015. Thrombotic role of blood and endothelial cells in uremia through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *PLoS One.* **10** (11), e0142835.
11. Bonomini M., Sirolli V., Merciaro G., Antidormi T., Di Liberato L., Brummer U., Papponetti M., Cappelli P., Di Gregorio P., Arduini A. 2005. Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20** (2), 361–366.
12. Luo J.F., Li J.H., Nie J.J., Li P.P., Zhang H.D., Ma Y.J. 2019. Effect of hemodialysis on the red blood cell life span in patients with end-stage kidney disease. *Ther. Apher. Dial.* **23** (4), 336–340.
13. Scherer A., Günther O.P., Balshaw R.F., Hollander Z., Wilson-McManus J., Ng R., McMaster W.R., McManus B.M., Keown P.A. 2013. Alteration of human blood cell transcriptome in uremia. *BMC Med. Genomics.* **6**, 23.
14. Antonelou M.H., Kriebardis A.G., Velentzas A.D., Kokkalis A.C., Georgakopoulou S.C., Papassideri I.S. 2011. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J. Proteomics.* **74** (11), 2441–2452.
15. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R. 2018. Squeezing for life – Properties of red blood cell deformability. *Front. Physiol.* **9**, 656.
16. McMahon T.J. 2019. Red blood cell deformability, vasoactive mediators, and adhesion. *Front. Physiol.* **10**, 1417.
17. Orbach A., Zelig O., Yedgar S., Barshtein G. 2017. Biophysical and biochemical markers of red blood cell fragility. *Transfus. Med. Hemother.* **44** (3), 183–187.
18. Kikuchi Y., Koyama T., Koyama Y., Tozawa S., Arai T., Horimoto M., Kakiuchi Y. 1982. Red blood cell deformability in renal failure. *Nephron.* **30** (1), 8–14.
19. Barns S., Balanant M.A., Sauret E., Flower R., Saha S., Gu Y. 2017. Investigation of red blood cell mechanical properties using AFM indentation and coarse-grained particle method. *Biomed. Eng. Online.* **16** (1), 140.
20. Bowry S.K., Gatti E. 2011. Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: The potential mechanisms. *Blood Purif.* **32** (3), 210–219.
21. Тугушева Ф.А., Зубина И.М. 2009. Оксидативный стресс и его участие в неиммунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек. *Нефрология.* **13** (3), 42–48.
22. Dutka P. 2008. Guarding against hidden hemolysis during dialysis: An overview. *Nephrol. Nurs. J.* **35**, 45.
23. Ahmadmehrabi S., Tang W.H.W. 2018. Hemodialysis-induced cardiovascular disease. *Semin. Dial.* **31** (3), 258–267.

24. Depond M., Henry B., Buffet P., Ndour P.A. 2020. Methods to investigate the deformability of RBC during malaria. *Front. Physiol.* **10**, 1613.

25. Sohn M., Lee J.E., Ahn M., Park Y., Lim S. 2021. Correlation of dynamic membrane fluctuations in red blood cells with diabetes mellitus and cardiovascular risks. *Sci. Rep.* **11** (1), 7007.

26. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death. Differ.* **8**, 1143–1156.

27. Riley R.S., Ben-Ezra J.M., Goel R., Tidwell A. 2001. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J. Clin. Lab. Anal.* **15** (5), 267–294.

28. Mindukshev I.V., Sudnitsyna J.S., Skverchinskaya E.A., Andreyeva A.Yu., Dobrylko I.A., Senchenkova E.Yu., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P. 2019. Erythrocytes' reactions to osmotic, ammonium, and oxidative stress are inhibited under hypoxia. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* **13** (4), 352–364.

29. Sudnitsyna J.S., Skvertchinskaya E.A., Dobrylko I.A., Nikitina E.R., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P., Mindukshev I.V. 2016. Human erythrocyte ammonium transport is mediated by functional interaction of ammonium (RhAG) and anion (AE1) transporters. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* **10** (4), 301–310.

30. Sudnitsyna J., Skverchinskaya E., Dobrylko I., Nikitina E., Gambaryan S., Mindukshev I. 2020. Microvesicle Formation induced by oxidative stress in human erythrocytes. *Antioxidants (Basel).* **9** (10), 929.

31. Kanias T., Acker J.P. 2010. Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in desiccated red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **49** (4), 539–547.

32. Ly J., Marticorena R., Donnelly S. 2004. Red blood cell survival in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* **44**, 715–719.

33. Koma Y., Onishi A., Matsuoka H., Oda N., Yokota N., Matsumoto Y., Koyama M., Okada N., Nakashima N., Masuya D., Yoshimatsu H., Suzuki Y. 2013. Increased red blood cell distribution width associates with cancer stage and prognosis in patients with lung cancer. *PLoS One.* **8** (11), e80240.

34. Evans E.A., Hochmuth R.M. 1976. Membrane viscoelasticity. *Biophys. J.* **16** (1), 1–11.

35. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L., Peters L.L., Chasis J.A., Delaunay J., Mohandas N., Anstee D.J., Tanner M.J. 2003. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood.* **101** (10), 4180–4188.

36. Борисов Ю.А., Судницына Ю.С., Власов Т.Д., Дульнева Л.В., Аболмасов В.О., Миндукшев И.В., Смирнов А.В. 2020. Уремический синдром вызывает нарушение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов у пациентов хронического гемодиализа. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **106** (8), 1025–1040.

37. Evans B.A., Ansari A.K., Kamyszek R.W., Salvagno M., Welsby J., Fuller M., Welsby I. 2021. Modulation of red blood cell oxygen affinity with a novel allosteric modifier of hemoglobin is additive to the Bohr effect. *Blood Cells Mol. Dis.* **87**, 102520.

38. Jensen F.B. 2009. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: Oxygen carriers and regulators of local blood flow. *J. Exp. Biol.* **212** (Pt21), 3387–3393.

39. Chintagari N.R., Jana S., Alayas A.I. 2016. Oxidized ferric and ferryl forms of hemoglobin trigger mitochondrial dysfunction and injury in alveolar type I cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **55**, 288–298.

40. Pantaleo A., Ferru E., Pau M.C., Khadjavi A., Mandili G., Mattè A., Spano A., De Franceschi L., Pippia P., Turrini F. 2016. Band 3 erythrocyte membrane protein acts as redox stress sensor leading to its phosphorylation by p (72) Syk. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 6051093.

41. Sugie J., Intaglietta M., Sung L.A. 2018. Water transport and homeostasis as a major function of erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **314** (5), H1098–H1107.

42. Jani V.P., Lucas A., Jani V.P., Munoz C., Williams A.T., Ortiz D., Yalcin O., Cabrales P. 2020. Numerical model for the determination of erythrocyte mechanical properties and wall shear stress in vivo from intravital microscopy. *Front. Physiol.* **10**, 1562.

43. Van Avondt K., Nur E., Zeerleder, S. 2019. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **15,** 671–692.

44. Deltombe O., Van Biesen W., Glorieux G., Massy Z., Dhondt A., Eloot S. 2015. Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis. *Toxins (Basel).* **7** (10), 3933–3946.

45. Itano H.A., Keitel H.G., Thompson D. 1956. Hyposthenuria in sickle cell anemia: A reversible renal defect. *J. Clin. Invest.* **35** (9), 998–1007.

46. Bonomini M., Pieroni L., Ronci M., Sirolli V., Urbani A. 2018. Blood cell proteomics in chronic kidney disease. *Open Urology and Nephrology.* **11**, 28–38.

47. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J. M. 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* **5**, 84.

48. Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., Metodiev M.V., Cooper C.E. 2017. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic. Biol. Med.* **103**, 95–106.

49. Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D., Lindberg F.P. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science.* **288** (5473), 2051–2054.

50. Судницына Ю.С., Гамбарян С.П., Кривченко А.И., Миндукшев И.В. 2018. Импорт аммиака/аммония в эритроциты человека. *Биол. мембраны.* **35** (5), 398–402.

Alterations in Erythrocyte Deformability and Functions in End-Stage Renal Disease

J. S. Sudnitsyna[1, 2, *, #], E. A. Skverchinskaya[2, #], I. M. Zubina[3], E. D. Suglobova[3], T. D. Vlasov[3], A. V. Smirnov[3], A. V. Vasiliev[3], T. O. Ruzhnikova[2], B. A. Kaljuzhnyi[2], I. V. Mindukshev[2], Yu. A. Borisov[3]

[1]*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

[2]*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia*

[3]*Pavlov First St.-Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia*

**e-mail: julia.sudnitsyna@gmail.com*

[#]*Equal contribution*

End-stage renal disease (ESRD) is associated with a range of erythrone alterations, such as structural and functional changes of circulating erythrocytes, which are the potential risk factors to cause erythrocyte malfunctions and corresponding anemia of different severity; however, the mechanisms of such changes in erythrocytes remain understudied. Here we used flow cytometry for estimation of the changes in intracellular esterase activity, phosphatidylserine externalization, and reticulocyte count and state; laser diffraction for osmotic and ammonium stress tests, and spectrophotometry for oxidized hemoglobin evaluation in erythrocytes of patients with ESRD before and after the hemodialysis (HD) session. Erythrocytes of ESRD patients were more osmotically fragile and had increased swelling rate in ammonium stress test. HD did not affect erythrocyte deformability but lead to hemoglobin oxidation to ferryl forms and triggered apoptosis-like events, such as a decrease in the intracellular esterase activity and increase in the number of annexin-positive cells. Our data indicate that uremic syndrome, combined with the mechanical effects of the HD system, challenges the erythron of HD patients and contributes to a multifactorial decrease in erythrocyte function and aggravation of renal anemia.

Keywords: erythrocytes, end-stage renal disease (ESRD), oxidative stress, ammonium stress, osmotic fragility test

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 464–473

УДК 57.053.4

АНТИТРОМБОЦИТАРНЫЙ ЭФФЕКТ НОБИЛЕТИНА ОПОСРЕДОВАН АКТИВАЦИЕЙ АДЕНОЗИНОВОГО РЕЦЕПТОРА A_{2A}

© 2021 г. В. С. Шпакова[a], *, А. В. Авдеева[b], Н. Аль Араве[b], А. М. Прилепская[b], С. П. Гамбарян[a], Е. С. Алексеева[b], Н. И. Рукояткина[a]

[a]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия*

[b]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия*

**e-mail: spakovavalentina@gmail.com*

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.
После доработки 27.05.2021 г.
Принята к публикации 31.05.2021 г.

Нобилетин – полиметоксилированный флавон, выделяемый из кожуры цитрусовых, который обладает множеством полезных свойств. В частности, нобилетин способен оказывать противовоспалительное, антибактериальное и антиоксидантное действие. Недавние исследования показали, что нобилетин снижает адгезию и агрегацию тромбоцитов, что делает возможным его использование в профилактике и лечении тромбообразования, однако точные механизмы его действия на тромбоциты неизвестны. В связи с этим основной целью данной работы являлось исследование молекулярных механизмов ингибирования тромбоцитов, опосредованного нобилетином. Мы показали, что нобилетин блокирует индуцированную активацию тромбоцитов, не вызывая при этом их гибель. Ингибирующий эффект нобилетина на тромбоциты по крайней мере частично обусловлен активацией рецептора A_{2A} к аденозину и запуском сигнальной системы АЦ/cAMP/PKA.

Ключевые слова: тромбоциты, нобилетин, антитромбоцитарная терапия, циклический аденозинмонофосфат, циклический гуанозинмонофосфат, PKA, PKG, аденозиновый рецептор

DOI: 10.31857/S0233475521060104

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты – это небольшие безъядерные клетки, образующиеся из мегакариоцитов в красном костном мозге, выполняющие множество функций в организме. Тромбоциты вовлечены в поддержание и регуляцию сосудистого тонуса, участвуют в транспорте веществ [1], процессах врожденного иммунитета [2, 3], однако основной функцией тромбоцитов является регуляция гемостаза [4].

В норме интактные клетки эндотелия блокируют процессы активации тромбоцитов за счет синтеза ингибирующих сигнальных молекул [5]. При повреждении кровеносного сосуда эта супрессия прекращается и происходит запуск активирующих сигнальных каскадов, приводящих к адгезии и последующей агрегации тромбоцитов с образованием тромба для предотвращения кровотечения [6]. Нарушение функционирования тромбоцитов способствует развитию тромбофилии или тромбоцитопатии [7].

Нормальный гемостаз может быть нарушен патологическими факторами, приводящими к неконтролируемому образованию тромба и частичной или полной закупорке сосудов [8]. Тромбоциты играют важную роль в патогенезе тромбозов, являясь одним из главных медиаторов тромбообразования [9]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, тромбозы являются одной из основных причин смертности по всему миру [10], однако применение доступных на текущий момент противотромбозных препаратов осложнено рядом ограничений и возможностью возникновения серьезных побочных эффектов, включая сильные кровотечения [11]. В связи с этим в настоящее время поиск более совершенных лекарственных средств для профилактики и лечения тромбоза является приоритетным направлением исследований.

Флавоноиды – группа фенольных соединений растительного происхождения, характеризующаяся структурным разнообразием, широким спектром активностей и низкой токсичностью. Эпидемиологические исследования продемонстрировали, что регулярное употребление богатой флавоноидами пищи снижает риск возникнове-

ния болезней сердечно-сосудистой системы, в частности, за счет способности веществ этой группы снижать уровень жиров и поддерживать целостность кровеносных сосудов [12]. Среди полиметоксилированных флавонов особый интерес исследователей привлекает нобилетин. Данное вещество содержится в высоких концентрациях в кожуре неспелых цитрусовых и обладает множеством полезных свойств. В частности, нобилетин оказывает противовоспалительное [13], нейропротекторное [14], антибактериальное и антиоксидантное действия [15]. Кроме того, исследования на различных линиях раковых клеток показали, что нобилетин обладает противораковой активностью за счет способности ингибировать рост и миграцию клеток и вызывать арест клеточного цикла и запуск апоптоза [16, 17]. В то же время в неопухолевых клетках данное вещество способно блокировать апоптоз, оказывая протекторное действие [18, 19].

В последнее время активно рассматривается возможность применения нобилетина в профилактике и лечении тромбообразования. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что нобилетин способен ингибировать активацию и снижать адгезивные свойства тромбоцитов [20, 21], однако точные механизмы его действия на тромбоциты неизвестны. В связи с этим целью данной работы являлось исследование действия нобилетина на функциональное состояние тромбоцитов.

В настоящей работе было исследовано влияние нобилетина на тромбин- и CRP-XL-опосредованную активацию тромбоцитов, а также проверена способность нобилетина индуцировать апоптоз или образование прокоагулянтных тромбоцитов. Мы показали, что нобилетин блокирует активацию тромбоцитов, не вызывая их гибель или переход в прокоагулянтное состояние. При этом ингибирование тромбоцитов нобилетином, по крайней мере частично, опосредовано активацией рецептора A_{2A} к аденозину и запуском АЦ/cAMP/PKA сигнальной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались следующие реактивы: нобилетин (Sigma-Aldrich, Германия), фибриноген меченый Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes, Германия), тромбин, выделенный из человеческой плазмы (Roche, Германия), перекрестносшитый родственный коллагену пептид (CRP-XL), любезно предоставленный проф. М.А. Пантелеевым (Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва), аннексин V, конъюгированный с R-фикоэритрином (BD-Bioscience, Германия), индуктор апоптоза ABT-737 (Selleckchem, Германия), SQ22563 и ODQ (Sigma-Aldrich), форсколин (Sigma-Aldrich), SNP (Alexis Biochemicals, Германия), Cay 10441 (Cayman Chemical, США), L161 982 (Sigma-Aldrich), ZM 241385 (Sigma-Aldrich), BW A868C (Cayman Chemical, США), моноклональные фосфо-VASPser239-антитела (Nano Tools, Германия), антитела к каспазе 3 (Cell Signalling, Германия), конъюгированные с пероксидазой хрена anti-mouse и anti-rabbit IgG вторичные антитела (Amersham, Германия).

Выделение тромбоцитов. Тромбоциты человека выделяли из крови здоровых доноров. Все экспериментальные протоколы были утверждены и одобрены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (протокол № 3-03 от 02.03.20) и соответствуют Хельсинкской декларации. Кровь собиралась в пробирку с цитратным буфером (12 мМ лимонной кислоты, 15 мМ цитрата натрия, 25 мМ *D*-глюкозы, 2 мкМ EGTA) и затем центрифугировалась 7 мин при 200 *g* (центрифуга CM-6M ELMI). Полученную плазму, обогащенную тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP), разводили в HEPES-буфере (150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 1 мМ хлорида кальция, 5 мМ *D*-глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4) в соотношении 1 : 10. Для экспериментов на отмытых тромбоцитах PRP разводили раствором CGS (120 мМ хлорида натрия, 12 мМ тринатрий цитрата, 10 мМ *D*-глюкозы, pH 6.5) в пропорции 1 : 2 и центрифугировали при 330 *g* в течение 4 мин. Полученный осадок растворяли в 1.5 мл раствора CGS и вновь центрифугировали 4 мин при 330 *g*, после чего осадок ресуспендировали в HEPES-буфере. Далее к отмытым тромбоцитам добавляли $CaCl_2$ в конечной концентрации 1 мМ. Для проведения опытов использовали рабочую концентрацию тромбоцитов 1×10^8/мл для проточной цитометрии и 3×10^8/мл для Вестерн-блот-анализа.

Проточная цитометрия. Уровень активация тромбоцитов оценивался по степени связывания активированных интегринов αIIbβ3 с фибриногеном, меченным флуоресцентным красителем Alexa-Fluor 647. К 100 мкл отмытых тромбоцитов (1×10^8/мл) добавляли фибриноген (15 мкг/мл, конечная концентрация) и нобилетин в конечных концентрациях 12.5, 25 или 75 мкМ, после чего тромбоциты инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Затем в пробы добавляли тромбин (10 mU), CRP-XL (0.5 мкг × мл$^{-1}$, конечная концентрация), инкубировали еще 4 мин при 37°C и останавливали реакцию в 400 мкл фосфатного буфера. Для экспериментов на PRP в разбавленную плазму при комнатной температуре вводили фибриноген (15 мкг/мл, конечная концентрация) и ингибитор аденозинового рецептора A_{2A} (ZM 241385), инкубировали 10 мин, после чего добавляли нобилетин в конечной концентрации 50 мкМ и инкубировали еще 10 мин. Далее в про-

бы добавляли ADP, инкубировали еще 4 мин и в каждую пробирку добавляли $CaCl_2$ в конечной концентрации 1 мМ, после чего останавливали реакцию 400 мкл фосфатного буфера.

Для оценки экстернализации фосфатидилсерина (PS) использовали аннексин V, конъюгированный с фикоэритрином (PE). После добавления аннексина V–PE в пробы (1 : 10) суспензию сразу растворяли в 400 мл аннексин V связывающего буфера (140 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, 2.5 мМ $CaCl_2$), необходимого для связывания аннексина V–PE с PS, после чего пробы инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте. В качестве положительного контроля использовали индуктор апоптоза ABT-737 (1 мкМ), с которым тромбоциты инкубировали в течение 60 мин (37°C).

Анализ проводился на проточном цитофлуориметре NaviousTM (Beckman Coulter, США; прибор ЦКП ИЭФБ РАН). Каждый образец оценивался по 15000 событиям. Полученные данные обрабатывались при помощи Cytometry List Mode Data Aquisition & Analysis Software for Navios cytometer 1.2.

Вестерн-блот-анализ. Для определения активации каспазы 3 пробы инкубировали с нобилетином (1, 10 и 50 мкМ) в течение 10 мин при 37°C, после чего в пропорции 1 : 1 добавляли лизирующий буфер, содержащий додецилсульфатнатрия (SDS) и меркаптоэтанол (10%). Затем пробы кипятили 5 мин при 95°C. В качестве положительного контроля использовали ABT-737 (1 мкМ, конечная концентрация, 60 мин).

Для определения степени фосфорилирования белка VASP отмытые тромбоциты инкубировали с нобилетином в концентрациях 1, 12.5, 25, 50 и 100 мкМ в течение 1, 2, 10 и 30 мин, после чего в пробы вводили лизирующий буфер (1 : 1).

Для оценки вклада cAMP- и cGMP-зависимых сигнальных путей в ингибирующий эффект нобилетина к тромбоцитам добавляли ингибитор аденилатциклазы (АЦ) SQ22536 (100 мкМ) или ингибитор гуанилатциклазы (ГЦ) ODQ (20 мкМ) и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Далее в суспензию тромбоцитов вводили нобилетин (25 мкМ) и инкубировали еще 10 мин. Затем в пробы вносили лизирующий буфер, после чего кипятили пробы при 95°C в течение 5 мин. В качестве положительного контроля использовались активатор АЦ форсколин в концентрации 1 мкМ (2 мин инкубации) и донор окиси азота нитропруссид натрия (SNP, 1 мкМ, 2 мин).

Белки разделяли при помощи электрофореза в SDS полиакриламидном геле (SDS-PAGE), затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи мокрого переноса (wet transfer). Далее мембрану отмывали в растворе TBS-T (20 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) в течение 30 мин, после чего мембрану инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. Неспецифическое связывание блокировали 3% раствором обезжиренного молока, растворенного в TBS-T буфере. Для визуализации сигнала применялись вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Проявка мембран осуществлялась при помощи сканера C-DiGit (Li-COR, США). Анализ хемилюминесценции проводили с использованием Image Studio Digits Ver.5.2.

Статистическая обработка. Все эксперименты были выполнены в количестве не менее четырех. Данные выражались как среднее арифметическое ± ± ошибка среднего. Статистическая обработка проводилась с помощью программы GraphPad-Prism v8. Достоверность различий средних значений между группами определялась по U-критерию Манна–Уитни. Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми, $n = 6$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нобилетин блокирует тромбин- и CRP-индуцированную активацию тромбоцитов. Для оценки действия нобилетина на активацию тромбоцитов в качестве агонистов были использованы тромбин и CRP-XL, действие которых опосредуется связыванием с разными группами рецепторов и запуском различных сигнальных каскадов. Тромбин-опосредованная активация происходит за счет взаимодействия с PAR-рецепторами, тогда как синтетический пептид CRP-XL, имитируя трехспиральную структуру коллагена, связывается с рецептором к коллагену GPVI [22]. Нобилетин дозозависимо ингибировал тромбин- и CRP-XL опосредованную активацию тромбоцитов (рис. 1). При этом нобилетин ингибировал активацию тромбоцитов, вызванную CRP-XL, в меньших концентрациях по сравнению с тромбин-опосредованной активацией (рис. 1).

Нобилетин не вызывает апоптоз тромбоцитов. Для нобилетина показана способность блокировать апоптоз в неопухолевых клетках и, наоборот, вызывать программируемую гибель в опухолевых клетках [23]. Известно, что активация апоптоза в тромбоцитах может приводить к блокированию их активации, поэтому мы проверили, способен ли нобилетин индуцировать гибель тромбоцитов [24]. Была проведена серия экспериментов по оценке степени экстернализации PS на поверхности тромбоцитов и активации каспазы 3 после инкубации с нобилетином.

Введение нобилетина во всех исследуемых дозах не вызывало переход PS на внешний слой плазматической мембраны тромбоцитов (рис. 2*а*) и не приводило к активации каспазы 3 (рис. 2*б*), которая является основным эффекторным белком в процессе апоптоза в клетках.

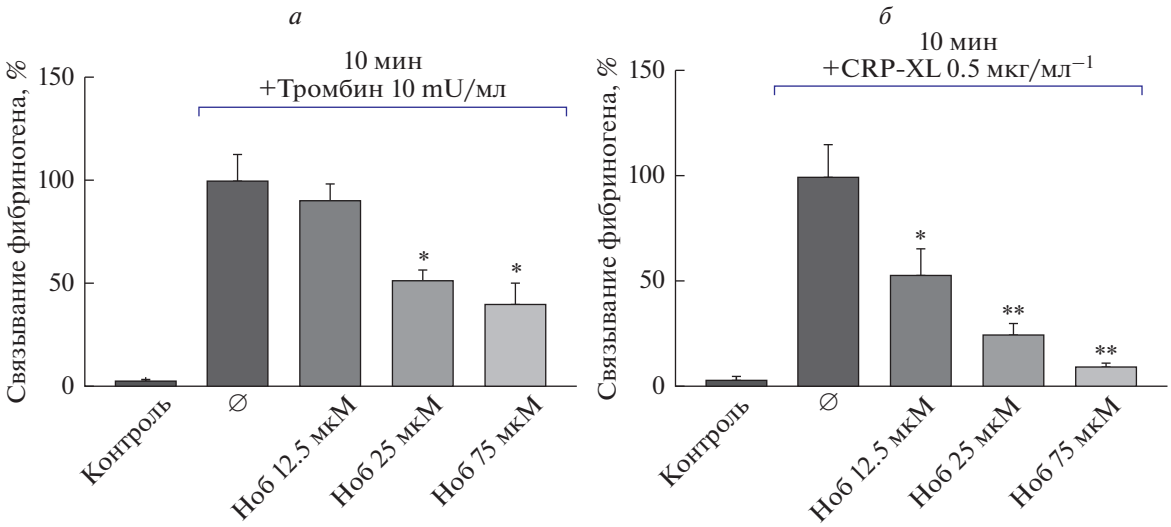

Рис. 1. Нобилетин ингибирует тромбин- и CRP-XL опосредованную активацию тромбоцитов. Исследование проводили на проточном цитометре. (*а*, *б*) Отмытые тромбоциты (1×10^8/мл) инкубировали с нобилетином в концентрациях 12.5, 25 и 75 мкМ в течение 10 мин. Активация интегринов αIIbβ3, вызванная тромбином или CRP-XL (∅), принята за 100%, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

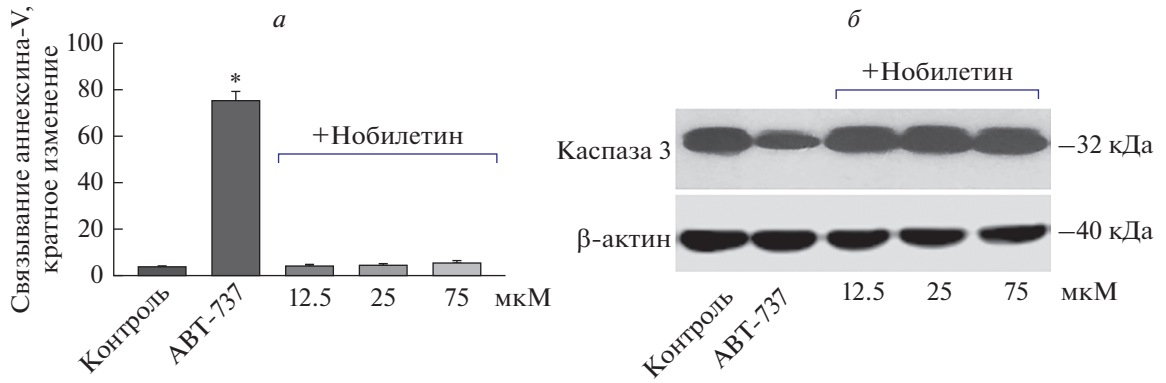

Рис. 2. Нобилетин не вызывает апоптоз тромбоцитов. (*а*) Отмытые тромбоциты (1×10^8/мл) инкубировали с нобилетином в концентрации 12.5, 25 и 75 мкМ в течение 10 мин, после чего анализировали на проточном цитометре. Активатор апоптоза АВТ-737 использовали в качестве позитивного контроля. Уровень экстернализации PS оценивался по степени связывания с аннексином V, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. (*б*) Вестерн-блот каспазы 3. Отмытые тромбоциты (3×10^8/мл) инкубировали с нобилетином в концентрации 12.5, 25 и 75 мкМ в течение 10 мин. Активатор апоптоза АВТ-737 использовали в качестве позитивного контроля. Актин использовали для контроля количества белка.

Нобилетин активирует АЦ/cAMP/PKA сигнальный путь в тромбоцитах. Состояние покоя тромбоцитов в просвете сосуда обеспечивается функционированием двух основных сигнальных систем – cAMP- и cGMP-зависимой. Активация аденилатциклазы (АЦ) и гуанилатциклазы (ГЦ) приводит к повышению концентраций cAMP и cGMP, что ведет к активации протеинкиназы A (PKA) и протеинкиназы G (PKG) [25]. Одним из субстратов этих протеинкиназ является белок VASP, фосфорилирование которого служит надежным маркером активации ингибиторных PKA/PKG сигнальных систем в тромбоцитах (рис. 3) [25]. При этом PKA фосфорилирует VASP преимущественно по сайту Ser157, а PKG – по Ser239, однако при сильной активации любой из киназ происходит фосфорилирование VASP по обоим сайтам. Важно отметить, что фосфорилированный по Ser157 VASP при белковом электрофорезе подвергается шифтированию с 46 до 50 кДа, что отражается на блоте появлением второй (верхней) полосы [26]. Специфичные фосфо-Ser239 антитела, которые использовались в нашей работе, позволяют детектировать фосфорилирование VASP по Ser239, однако появление на блоте второй полосы свидетельствует о фосфорилировании белка VASP по обоим сайтам [26].

Нобилетин вызывал фосфорилирование VASP во всех исследуемых дозах (рис. 3*а*), при этом интенсивность фосфорилирования по обоим сайтам возрастала со временем (рис. 3*б*). Эти данные свидетельствуют о том, что нобилетин вызывает

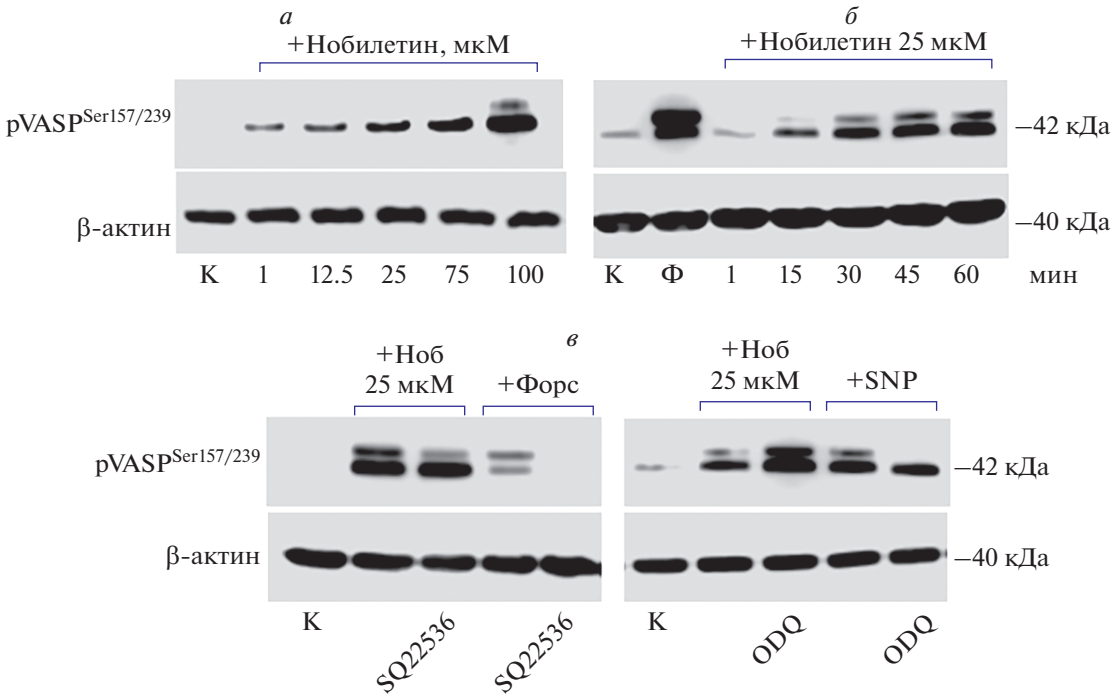

Рис. 3. Нобилетин вызывает фосфорилирование белка VASP в тромбоцитах путем активации АЦ/cAMP/PKA сигнального пути. Отмытые тромбоциты (3×10^8/мл) инкубировали с нобилетином (*а*) в указанных концентрациях и (*б*) указанное время. Форсколин (Ф) использовали в качестве позитивного контроля. *в* – Тромбоциты инкубировали с SQ 22536 (100 мкМ) или ODQ (20 мкМ) в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин и инкубировали еще 30 мин. Активность PKA/PKG определяли по форфорилированию белка VASP. В качестве позитивного контроля использовали форсколин и SNP. Актин использовали для контроля количества белка. К – контроль.

активацию PKA/PKG сигнальных систем в тромбоцитах.

Для определения вклада cAMP и cGMP-зависимых сигнальных путей в ингибирующий эффект нобилетина использовали SQ22536, блокирующий АЦ, и ODQ, ингибирующий ГЦ. Контролем к данной серии опытов служили специфичные активаторы АЦ (форсколин) и ГЦ (SNP). Вестерн-блот-анализ показал, что SQ22536 уменьшал интенсивность фосфорилирования VASP, вызванного нобилетином в концентрации 25 мкМ, тогда как ODQ не блокировал нобилетин-опосредованное фосфорилирование VASP (рис. 3*в*). Эти данные свидетельствуют о том, что ингибиторный эффект нобилетина может быть опосредован запуском cAMP-зависимого сигнального каскада.

Действие нобилетина опосредовано активацией аденозинового A_{2A}-рецептора. Основным путем активации АЦ и запуска синтеза cAMP в тромбоцитах является рецепторный путь, поэтому мы проверили, опосредовано ли действие нобилетина активацией поверхностных рецепторов на тромбоцитах, участвующих в регуляции АЦ/cAMP/PKA сигнального пути.

На тромбоцитах представлены несколько рецепторов, способных активировать АЦ и запускать синтез cAMP с последующей активацией PKA. Все они относятся к рецепторам, ассоциированным с G-белком, и содержат $G_{\alpha s}$-субъединицу в своем составе. Большинство этих рецепторов являются простагландиновыми и активируются после связывания с соответствующим типом простагландина. Так, в тромбоцитах экспрессируется рецептор DP1, который селективно связывается с простагландином D, рецепторы EP2 и EP4, которые связываются с простагландином E2, и IP-рецептор к простагландину I2 [27]. Помимо простагландинов, вызывать увеличение уровня cAMP в тромбоцитах может аденозин, который выделяется при повреждении клеток и связывается с аденозиновым A_2-рецептором на тромбоцитах [28]. Для того чтобы определить, какие из перечисленных рецепторов могут быть мишенями нобилетина, мы использовали ингибиторы к каждому из этих рецепторов и проанализировали фосфорилирование белка VASP (рис. 4). Ингибиторы рецепторов DP1 (BW A868C), IP (Cay10441) и EP4 (L-161,982) не блокировали фосфорилирование VASP, вызванное нобилетином (рис. 4*б*, 4*в*, 4*г*), тогда как ингибитор рецептора A_{2A} (ZM 241385) существенно снижал фосфорилирование VASP после введения нобилетина (рис. 4*а*). Ингибирование аденозинового A_{2A}-рецептора ZM 241385 при введении нобилетина приводило к частично-

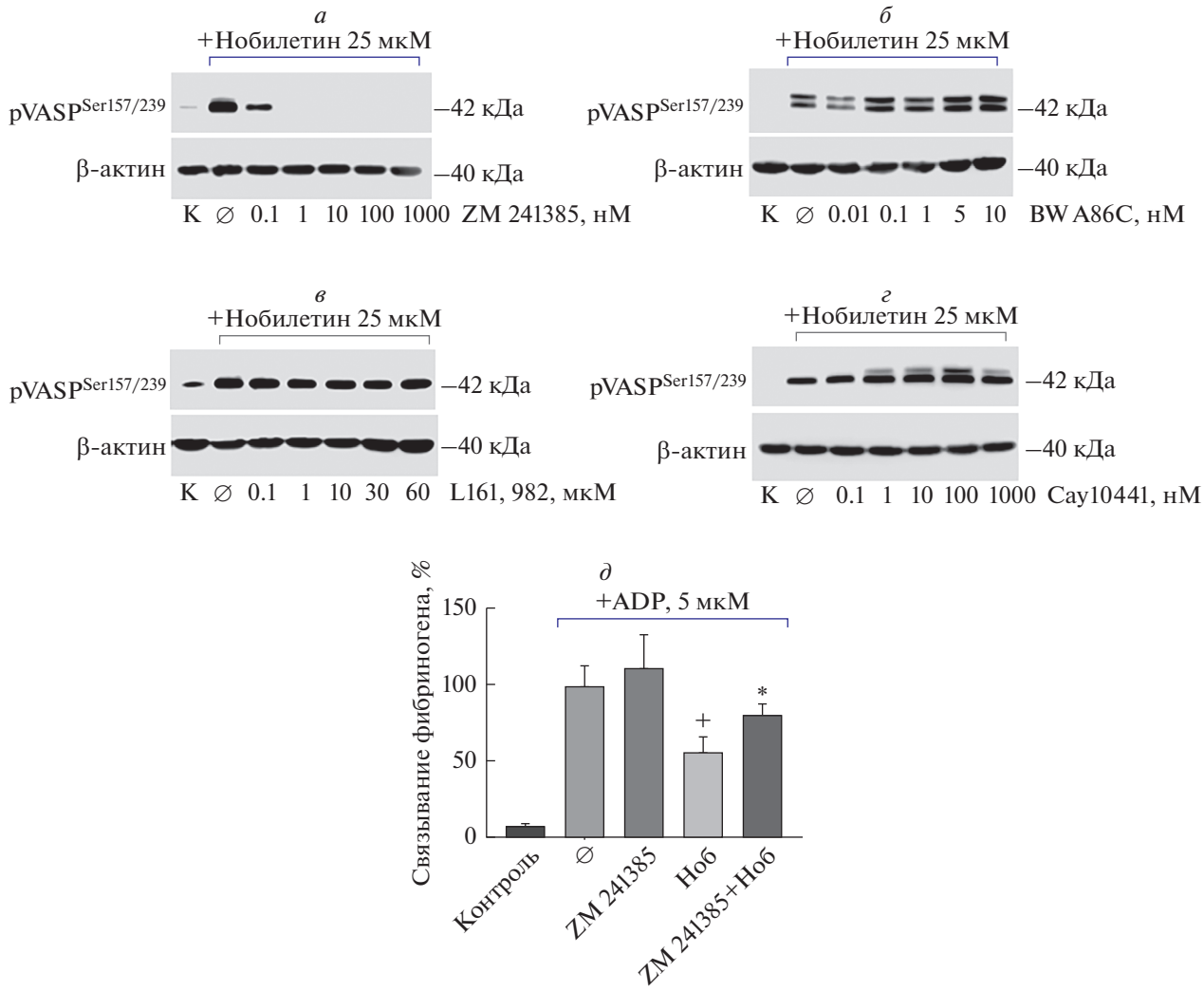

Рис. 4. Ингибирующее действие нобилетина на тромбоциты опосредовано активацией аденозинового рецептора A_{2A}. Отмытые тромбоциты (3×10^8/мл) инкубировали с ингибиторами рецепторов (*а*) ZM 241385, (*б*) BW A868C, (*в*) L161,982, (*г*) Cay10441 в указанных концентрациях в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин и инкубировали еще 30 мин. Актин использовали для контроля количества белка. (*д*) Плазму, обогащенную тромбоцитами, инкубировали с ингибитором аденозинового A_{2A}-рецептора (ZM 241385) в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин (50 мкМ) и инкубировали еще 10 мин. Далее тромбоциты активировали ADP (5 мкМ, 5 мин) и анализировали на проточном цитометре. Активация интегринов αIIbβ3, вызванная ADP (Ø), принята за 100%, $n = 9$; $^+$ различия между ADP (Ø) и Ноб достоверны при $p < 0.01$, * – различия между Ноб и Ноб+ZM 241385 достоверны при $p < 0.01$. Ноб – нобилетин, K – контроль.

му восстановлению фибриногенового связывания на тромбоцитах, активированных ADP (рис. 4*д*). Введение в пробы самого ZM 241385 вызывало незначительное увеличение фибриногенового связывания по сравнению с контролем (14 ± 0.7%, данные не представлены), а введение ZM 241385 совместно с ADP приводило к потенцированию активации тромбоцитов (11.8 ± 7.01%). Подобный эффект наблюдается вследствие того, что даже при снижении базального уровня cAMP может происходить активация тромбоцитов. Эти данные служат подтверждением того, что ингибирующее действие нобилетина на тромбоциты, по крайней мере частично, опосредовано активацией аденозинового рецептора A_{2A}.

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе действия полиметоксилированного флавона нобилетина на тромбоциты человека было обнаружено снижение адгезивных свойств тромбоцитов, что соответствует данным, полученным другими исследователями [29, 30]. Нами было показано, что нобилетин дозозависимо ингибирует активацию интегринов αIIbβ3 на тромбоцитах, вызванную как тромбином, являющим-

ся агонистом PAR-рецепторов, так и CRP-XL, связывающимся с GPVI-рецептором. При этом ингибиторный эффект достигается при более низких дозах исследуемого вещества у тромбоцитов, стимулированных CRP (рис. 1). Необходимость больших доз нобилетина для блокирования PAR 1-сигнальной системы вероятно связана с тем, что тромбин является более сильным активатором и вызывает необратимую активацию тромбоцитов, поддерживаемую усилением синтеза и высвобождения вторичных активаторов, таких как ADP и TxA2 [31].

В исследованиях на неопухолевых клетках нобилетин оказывал антиапоптотическое действие, ингибируя запуск апоптоза. В частности, в клетках, изолированных из островков Лангерганса, данное соединение подавляло экспрессию проапоптотических белков и усиливало синтез антиапоптотического белка BCL-2 [32]. Вместе с тем на различных линиях раковых клеток была продемонстрирована способность нобилетина индуцировать апоптоз в опухолевых клетках [23], в связи с чем в настоящее время данное соединение рассматривается в качестве перспективного противоопухолевого агента. В работе Lu и соавт. было показано, что даже в высоких концентрациях (100 мкМ) нобилетин не вызывает цитолиз тромбоцитов [30], однако в литературе отсутствуют данные о том, вызывает ли исследуемое вещество апоптоз тромбоцитов. В наших экспериментах нобилетин не индуцировал переход тромбоцитов в прокоагулянтное состояние и не вызывал запуск апоптоза (рис. 2). Отсутствие цитотоксического эффекта, сопряженное со способностью блокировать адгезию и агрегацию тромбоцитов, является преимуществом нобилетина и как антиагрегантного средства, и как противоопухолевого препарата в связи с повышенным риском тромбоза у онкологических больных [33] и вклада активированных тромбоцитов в метастазирование и ангиогенез [34].

В настоящее время существует два основных подхода определения активности АЦ/cAMP/PKA и ГЦ/cGMP/PKG сигнальных систем в тромбоцитах. Первый подход связан с использованием ингибиторов или активаторов самих PKA и PKG. Однако активаторы (8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP, 8-Br-PET-cGMP) и ингибиторы (Rp-8-PCPT-cGMPS, Rp-8-Br-PET-cGMPS) PKG способны активировать и ингибировать тромбоциты независимо от действия на данную протеинкиназу [35]. Кроме того, доступные на сегодняшний день селективные ингибиторы PKA (H89 и KT5720) не являются специфичными и обладают даже большей аффинностью к другим протеинкиназам [36, 37]. Таким образом, не существует специфичных ингибиторов PKA и PKG, которые можно было бы использовать для изучения PKA/PKG ингибиторных систем в тромбоцитах.

Второй подход связан с уменьшением количества самих циклических нуклеотидов в тромбоцитах ингибиторами АЦ (SQ22536) и ГЦ (ODQ). Однако и этот подход нужно использовать с осторожностью, поскольку было показано, что иммуноферментные методы определения уровня cGMP часто дают ложноположительные результаты для тромбоцитов при определенных условиях [7]. Однако среди прочих ингибиторов SQ22536 и ODQ являются достаточно специфичными [38–40], в связи с чем для изучения эффекта нобилетина на тромбоциты были выбраны именно эти ингибиторы. Одним из самых достоверных и чувствительных методов оценки активности cAMP- и cGMP-зависимых сигнальных каскадов является анализ фосфорилирования белка VASP, используемого в качестве индикатора активности PKA и PKG в тромбоцитах [35].

Нобилетин вызывал дозозависимое фосфорилирование белка VASP, которое усиливалось со временем (рис. 3*а*, 3*б*). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что нобилетин способен активировать PKA и/или PKG в тромбоцитах, которые опосредуют его ингибиторный эффект.

В нашей работе было показано снижение вызванного нобилетином (25 мкМ) фосфорилирования VASP под воздействием SQ22536 при отсутствии эффекта ODQ (рис. 3*в*). Из этих данных следует, что ингибиторный эффект нобилетина может быть опосредован активацией АЦ и повышением концентрации cAMP в тромбоцитах с последующей активацией PKA. Однако в работе Jayakumar и соавт. в аналогичных опытах с использованием SQ22536 и ODQ (ингибиторы АЦ и ГЦ, соответственно) для определения вклада циклических нуклеотидов в нобилетин-опосредованную активацию протеинкиназ, данные вещества не влияли на степень фосфорилирования VASP, вызванного нобилетином в концентрации 30 мкМ [21]. Исходя из этих данных, авторы сделали вывод о том, что эффект нобилетина на тромбоциты не связан с повышением уровня циклических нуклеотидов [21]. В наших экспериментах более высокие дозы нобилетина (50 мкМ) также вызывали фосфорилирование VASP, которое не ингибировалось ни SQ22536, ни ODQ, однако действие нобилетина в меньших дозах (25 мкМ) частично блокировалось SQ22536. Эти данные явно указывают на наличие cAMP-зависимого эффекта действия нобилетина. Расхождение в данных, полученных нами и группой Jayakumar и соавт. можно объяснить тем, что, вероятно, EC50 для нобилетина находится на отметке 25 мкМ или ниже, поэтому ингибирующий эффект SQ22536 не наблюдается при более высоких дозах нобилетина. Кроме того, различия в методике выделения тромбоцитов и условиях проведения экспериментов также могли оказывать влияние на полученные результаты.

Известно, что некоторые флавоноиды способны активировать поверхностные клеточные рецепторы. В частности, в работе Liu и соавт. на клеточных линиях была показана способность некоторых флавоноидов активировать рецептор GRP 30 к эстрогену, повышая тем самым уровень cAMP в клетках [41]. Однако нет никаких данных относительно способности нобилетина специфически связывать и активировать клеточные рецепторы. В нашем исследовании действие нобилетина блокировалось ингибитором аденозинового рецептора A_{2A}, что свидетельствует о способности данного вещества активировать АЦ через воздействие на поверхностные рецепторы в тромбоцитах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы флавоноиды привлекают пристальное внимание ученых по всему миру, поскольку обладают множеством полезных биологических активностей и низкой токсичностью. Для нобилетина показаны антиоксидантная, противоопухолевая, цитопротекторная и противотромбозная активности. Однако механизм антитромбоцитарного действия нобилетина на молекулярном уровне остается малоизученным. Наша работа вносит существенный вклад в понимание внутриклеточных молекулярных механизмов, которые обуславливают действие нобилетина на тромбоциты. Нам удалось продемонстрировать, что нобилетин может влиять на активность рецепторов и вызывать активацию АЦ/cAMP/PKA сигнальной системы в тромбоцитах, чем и может быть обусловлена его противотромбозная активность.

Исследования методом проточной цитометрии выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90102 (ВС) и по ГЗ АААА-А18-118012290371-3 (ВС, НИ, СП).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании, были утверждены и одобрены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (протокол № 3-03 от 02.03.20) и соответствуют Хельсинкской декларации 1964 года. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaul S., Padgett R.C., Heistad D.D. 1994. Role of platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **714**, 122–135.
2. Hamzeh-Cognasse H., Damien P., Chabert A., Pozzetto B., Cognasse F., Garraud O. 2015. Platelets and infections – complex interactions with bacteria. *Front. Immunol.* **6**, 82.
3. Assinger A. 2014. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. *Front. Immunol.* **5**, 649.
4. Jurk K., Kehrel B.E. 2005. Platelets: Physiology and biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.* **31** (4), 381–392.
5. Makhoul S., Walter E., Pagel O., Walter U., Sickmann A., Gambaryan S., Smolenski A., Zahedi R.P., Jurk K. 2018. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. *Nitric Oxide.* **76**, 71–80.
6. Bye A.P., Unsworth A.J., Gibbins J.M. 2016. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J. Thromb. Haemost.* **14** (5), 918–930.
7. Gambaryan S., Tsikas D. 2015. A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: Do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids.* **47** (9), 1779–1793.
8. Papapanagiotou A., Daskalakis G., Siasos G., Gargalionis A., Papavassiliou A.G. 2016. The role of platelets in cardiovascular disease: Molecular mechanisms. *Curr. Pharm. Des.* **22** (29), 4493–4505.
9. Koupenova M., Kehrel B.E., Corkrey H.A., Freedman J.E. 2017. Thrombosis and platelets: An update. *Eur. Heart J.* **38** (11), 785–791.
10. Wendelboe A.M., Raskob G.E. 2016. Global burden of thrombosis: Epidemiologic aspects. *Circ. Res.* **118** (9), 1340–1347.
11. Thachil J. 2016. Antiplatelet therapy – a summary for the general physicians. *Clin. Med. (Lond).* **16** (2), 152–160.
12. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. 2016. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, e47.
13. Yang G., Lin C.C., Yang Y., Yuan L., Wang P., Wen X., Pan M.H., Zhao H., Ho C.T., Li S. 2019. Nobiletin prevents trimethylamine oxide-induced vascular inflammation via inhibition of the NF-kappaB/MAPK pathways. *J. Agric. Food Chem.* **67** (22), 6169–6176.
14. Nakajima A., Ohizumi Y. 2019. Potential benefits of nobiletin, a citrus flavonoid, against Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (14), 3380.
15. Huang H., Li L., Shi W., Liu H., Yang J., Yuan X., Wu L. 2016. The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2016**, 2918796.
16. Hsiao P.C., Lee W.J., Yang S.F., Tan P., Chen H.Y., Lee L.M., Chang J.L., Lai G.M., Chow J.M., Chien M.H. 2014. Nobiletin suppresses the proliferation and induces apoptosis involving MAPKs and caspase-8/-9/-3 signals in human acute myeloid leukemia cells. *Tumour Biol.* **35** (12), 11903–11911.

17. Sousa D.P., Pojo M., Pinto A.T., Leite V., Serra A.T., Cavaco B.M. 2020. Nobiletin alone or in combination with cisplatin decreases the viability of anaplastic thyroid cancer cell lines. *Nutr. Cancer.* **72** (2), 352–363.
18. Cho H.W., Jung S.Y., Lee G.H., Cho J.H., Choi I.Y. 2015. Neuroprotective effect of citrus unshiu immature peel and nobiletin inhibiting hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HT22 murine hippocampal neuronal cells. *Pharmacogn. Mag.* **11** (Suppl. 2), S284–S289.
19. Liu B., Huang J., Zhang B. 2016. Nobiletin protects against murine l-arginine-induced acute pancreatitis in association with downregulating p38MAPK and AKT. *Biomed. Pharmacother.* **81**, 104–110.
20. Ikemura M., Sasaki Y., Giddings J.C., Yamamoto J. 2012. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.* **26** (9), 1272–1277.
21. Jayakumar T., Lin K.C., Lu W.J., Lin C.Y., Pitchairaj G., Li J.Y., Sheu J.R. 2017. Nobiletin, a citrus flavonoid, activates vasodilator-stimulated phosphoprotein in human platelets through non-cyclic nucleotide-related mechanisms. *Int. J. Mol. Med.* **39** (1), 174–182.
22. Sodergren A.L., Ramstrom S. 2018. Platelet subpopulations remain despite strong dual agonist stimulation and can be characterised using a novel six-colour flow cytometry protocol. *Sci. Rep.* **8** (1), 1441.
23. Goh J.X.H., Tan L.T., Goh J.K., Chan K.G., Pusparajah P., Lee L.H., Goh B.H. 2019. Nobiletin and derivatives: Functional compounds from citrus fruit peel for colon cancer chemoprevention. *Cancers (Basel).* **11** (6), 867.
24. Rukoyatkina N., Butt E., Subramanian H., Nikolaev V.O., Mindukshev I., Walter U., Gambaryan S., Benz P.M. 2017. Protein kinase A activation by the anti-cancer drugs ABT-737 and thymoquinone is caspase-3-dependent and correlates with platelet inhibition and apoptosis. *Cell. Death Dis.* **8** (6), e2898.
25. Nagy Z., Smolenski A. 2018. Cyclic nucleotide-dependent inhibitory signaling interweaves with activating pathways to determine platelet responses. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **2** (3), 558–571.
26. Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Honig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U. 1998. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **273** (32), 20029–20035.
27. Braune S., Kupper J.H., Jung F. 2020. Effect of prostanoids on human platelet function: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (23), 9020.
28. Noe L., Peeters K., Izzi B., Van Geet C., Freson K. 2010. Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* **17** (26), 2897–2905.
29. Vaiyapuri S., Roweth H., Ali M.S., Unsworth A.J., Stainer A.R., Flora G.D., Crescente M., Jones C.I., Moraes L.A., Gibbins J.M. 2015. Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function. *Br. J. Pharmacol.* **172** (16), 4133–4145.
30. Lu W.J., Lin K.C., Liu C.P., Lin C.Y., Wu H.C., Chou D.S., Geraldine P., Huang S.Y., Hsieh C.Y., Sheu J.R. 2016. Prevention of arterial thrombosis by nobiletin: In vitro and in vivo studies. *J. Nutr. Biochem.* **28**, 1–8.
31. Holinstat M., Preininger A.M., Milne S.B., Hudson W.J., Brown H.A., Hamm H.E. 2009. Irreversible platelet activation requires protease-activated receptor 1-mediated signaling to phosphatidylinositol phosphates. *Mol. Pharmacol.* **76** (2), 301–313.
32. Keshtkar S., Kaviani M., Jabbarpour Z., Geramizadeh B., Motevaseli E., Nikeghbalian S., Shamsaeefar A., Motazedian N., Al-Abdullah I.H., Ghahremani M.H., Azarpira N. 2019. Protective effect of nobiletin on isolated human islets survival and function against hypoxia and oxidative stress-induced apoptosis. *Sci. Rep.* **9** (1), 11701.
33. Abdol Razak N.B., Jones G., Bhandari M., Berndt M.C., Metharom P. 2018. Cancer-Associated thrombosis: An overview of mechanisms, risk factors, and treatment. *Cancers (Basel).* **10** (10), 380.
34. Wojtukiewicz M.Z., Hempel D., Sierko E., Tucker S.C., Honn K.V. 2017. Antiplatelet agents for cancer treatment: A real perspective or just an echo from the past? *Cancer Metastasis Rev.* **36** (2), 305–329.
35. Гамбарян С.П., Шпакова, В.С. 2019. NO/цГМФ сигнальный путь в тромбоцитах. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **105** (8), 933–953.
36. Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351** (Pt 1), 95–105.
37. Bain J., McLauchlan H., Elliott M., Cohen P. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: An update. *Biochem. J.* **371** (Pt 1), 199–204.
38. Rukoyatkina N., Walter U., Friebe A., Gambaryan S. 2011. Differentiation of cGMP-dependent and -independent nitric oxide effects on platelet apoptosis and reactive oxygen species production using platelets lacking soluble guanylyl cyclase. *Thromb. Haemost.* **106** (5), 922–933.
39. Emery A.C., Eiden M.V., Eiden L.E. 2013. A new site and mechanism of action for the widely used adenylate cyclase inhibitor SQ22,536. *Mol. Pharmacol.* **83** (1), 95–105.
40. Lies B., Groneberg D., Gambaryan S., Friebe A. 2013. Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* **170** (2), 317–327.
41. Liu E.Y.L., Xu M.L., Xia Y., Kong X., Wu Q., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. 2019. Activation of G protein-coupled receptor 30 by flavonoids leads to expression of acetylcholinesterase in cultured PC12 cells. *Chem. Biol. Interact.* **306**, 147–151.

Antiplatelet Effect of Nobiletin is Mediated by Activation of A_{2A} Adenosine Receptor

V. S. Shpakova[1, *], A. V. Avdeeva[2], N. Al. Arawe[2], A. M. Prilepskaya[2], S. P. Gambaryan[1], E. S. Alekseeva[2], N. I. Rukoyatkina[1]

[1]Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia
[2]St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia
**e-mail: spakovavalentina@gmail.com*

Nobiletin is a polymethoxylated flavone isolated from citrus peels which possesses a wide range of beneficial effects. Specifically, nobiletin exerts anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant effects. Recent research showed that nobiletin is able to diminish platelet adhesion and aggregation, indicating this compound as a potential therapeutic drug in thrombosis therapy. However, the exact mechanism of nobiletin action on platelets is unclear. Hence, the main goal of our study was to investigate the molecular mechanism of nobiletin-induced platelet inhibition. We demonstrated that nobiletin blocks induced platelet activation and does not cause platelet apoptosis. Inhibition effect of nobiletin on platelets at least partly is mediated by activation of A_{2A} adenosine receptor and consequent AC/cAMP/PKA signaling pathway activation.

Keywords: platelets, nobiletin, antiplatelet therapy, adenosine monophosphate (AMP), guanosine monophosphate (cGMP), PKA, PKG, adenosine receptor

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 6, с. 474–477

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.465

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ НА НОРАДРЕНАЛИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОННОГО МОНИТОРИНГА Ca^{2+} И cAMP В КЛЕТКАХ HEK 293

© 2021 г.
Е. Н. Кочкина[a], *, О. А. Рогачевская[a], П. Д. Котова[a]

[a] *Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия*

**e-mail: kate-kochkina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 08.05.2021 г.
После доработки 23.07.2021 г.
Принята к публикации 25.07.2021 г.

Норадреналин играет важную роль в регуляции широкого круга физиологических процессов и распознается клетками различных типов с помощью адренергических рецепторов, которые сопряжены с фосфолипазным и аденилатциклазным сигнальными путями. В данной работе мы исследовали адренергическую систему клеток HEK 293 с использованием генетически кодируемых сенсоров GEM-GECO1 и Pink Flamindo для мониторинга внутриклеточных Ca^{2+} и cAMP соответственно. Нами показано, что в одиночных клетках HEK 293 норадреналин одновременно стимулирует и Ca^{2+}-сигнализацию, и продукцию cAMP. Интересной особенностью cAMP- и Ca^{2+}-сигналов оказалось то, что с повышением дозы норадреналина амплитуда cAMP-ответов росла градуально, в то время как величина Ca^{2+}-ответов не зависела от концентрации агониста. Физиологическая значимость таких зависимостей обсуждается.

Ключевые слова: адренергические рецепторы, норадреналин, Ca^{2+}-сигнализация, cAMP-сигнализация, генетически кодируемые сенсоры

DOI: 10.31857/S0233475521060050

ВВЕДЕНИЕ

Адреналин и норадреналин представляют собой катехоламины и функционируют как гормоны и нейромедиаторы, модулирующие активность различных органов и тканей, включая сердечно-сосудистую систему, почки, печень и мозг. Самые разнообразные клетки, от нейронов и кардиомиоцитов до мезенхимных стромальных клеток, экспрессируют гены, кодирующие адренорецепторы. Последние принадлежат к суперсемейству гептаспиральных рецепторов, сигнальная функция которых во многом обеспечивается взаимодействием с G-белками (G-protein coupled receptors). Идентифицировано девять генов, кодирующих адренорецепторы, которые на основе структурных и функциональных свойств отнесены к трем группам: α_1 (α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}), α_2 (α_{2A}, α_{2B}, α_{2C}) и β (β_1, β_2, β_3) [1]. Традиционно считалось, что α_1-адренорецепторы преимущественно сопряжены с $G_{q/11}$-белком, стимулирующим фосфолипазу C (PLC), α_2-адренорецепторы – с $G_{i/0}$-белком, ингибирующим активность аденилатциклазы (AC), а β-адренорецепторы связываются с G_s-белком, активирующим аденилатциклазу. Между тем данные, накопленные к настоящему моменту, свидетельствуют о том, что варианты сопряжения адренергических рецепторов с внутриклеточными сигнальными каскадами куда более разнообразны [2, 3]. Так, например, показано, что активация β-адренорецепторов может приводить к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} по cAMP-независимому пути [4].

В наших исследованиях адренергической системы мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека, было показано, что норадреналин инициирует Ca^{2+}-сигнализацию в МСК. Интересной особенностью этих Ca^{2+}-сигналов было то, что в малых концентрациях норадреналин не вызывал детектируемого увеличения уровня внутриклеточного Ca^{2+}, но начиная с пороговой дозы инициировал Ca^{2+}-ответы, величина которых фактически не зависела от концентрации агониста [5]. Иными словами, клетки генерировали Ca^{2+}-ответы на норадреналин по принципу “всё или ничего”; такой характер ответа ставит вопрос о том, как в МСК кодируется информация о величине приходящего стимула для формирования адекватной реакции на него. Было также неясно, насколько универсален данный тип клеточных ответов на агонисты. В

данной работе мы установили, что клетки HEK 293 также отвечают на норадреналин мобилизацией Ca^{2+} в цитозоле, при этом Ca^{2+}-ответы генерируются по принципу “всё или ничего” (рис. 1*а*, верхняя кривая, 1*б*). Таким образом, данный тип Ca^{2+}-ответа может быть достаточно универсальным, и в этом случае вопрос о кодировании интенсивности адренергических стимулов уже не сводился к анализу физиологических процессов в МСК. Возможно, клетки экспрессируют такой набор адренорецепторов, что норадреналин способен запускать в их цитозоле параллельные процессы, один из которых – мобилизация Ca^{2+}, а другой – например, генерация cAMP, каждый из которых нацелен на решение специфических задач клеточной физиологии. Нам представлялось интересным выяснить, вовлекает ли адренергическая сигнализация в клетках параллельные процессы, например Ca^{2+}-сигнализацию и cAMP-сигнализацию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мониторинг cAMP в живой клетке в режиме реального времени возможен только с помощью генетически кодируемых сенсоров, поскольку синтетических флуоресцентных cAMP-зондов на сегодняшний день не разработано. Поэтому для исследования внутриклеточных cAMP- и Ca^{2+}-сигналов мы использовали генетически кодируемые сенсоры внутриклеточного cAMP Pink Flamindo [6] и цитозольного Ca^{2+} GEM-GECO1 [7]. Эти молекулярные сенсоры были гетерологически экспрессированы в клетках линии HEK 293. Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 4.5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. Клетки трансфицировали плазмидными векторами Pink Flamindo и CMV-GEM-GECO1 (оба Addgene) с целью индукции экспрессии Pink Flamindo и GEM-GECO1. Для трансфекции использовали набор для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. В физиологических экспериментах использовали клетки через 24–48 ч после трансфекции. Для мониторинга внутриклеточных cAMP и Ca^{2+} клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning) и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 130, KCl – 5, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 1, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию Pink Flamindo и GEM-GECO1 возбуждали поочередно на длинах волн 480 ± 10 нм и 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм и 634 ± ± 34 нм соответственно. Изменение концентрации cAMP и Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Pink Flamindo и GEM-GECO1 соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общей сложности было проанализировано 226 клеток, для которых была характерна флуоресценция, индуцированная экспрессией одновременно обоих флуоресцентных белков – Pink Flamindo и GEM-GECO1. Оказалось, что стимуляция таких клеток норадреналином в различных дозах инициировала увеличение концентраций cAMP и/или Ca^{2+} в их цитозоле. Так, 152 клетки (67%) генерировали исключительно cAMP-ответы, 25 клеток (11%) генерировали только Ca^{2+}-ответы, а в 49 клетках (22%) наблюдалось увеличение уровня обоих вторичных медиаторов в ответ на норадреналин (рис. 1*а*). Таким образом, значительное большинство (89%) клеток HEK 293, чувствительных к норадреналину, генерировали cAMP-ответы, тогда как агонист-зависимая мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} наблюдалась лишь в 33% субпопуляции. Такая функциональная гетерогенность клеток HEK 293, видимо, отражает их молекулярную гетерогенность в том отношении, что индивидуальная клетка характеризуется специфическим паттерном экспрессии генов адренорецепторов и/или специфическими механизмами их сопряжения с внутриклеточными сигнальными каскадами. С этих позиций можно объяснить количественное противоречие, состоящее в том, что адренорецепторы экспрессируются в большинстве МСК [8], в то время как норадреналин мобилизует Ca^{2+} лишь в небольшой (5–15%) популяции этих клеток [5].

Генерация Ca^{2+}-ответов на норадреналин клетками HEK 293 подчинялась принципу “всё или ничего”, т.е. при стимуляции агонистом в подпороговых концентрациях ответы не детектировались, тогда как амплитуда ответов на агонист в любых концентрациях, превышающих пороговую, была практически одинаковой (рис. 1*а*, верхняя кривая, 1*б*). Пороговая концентрация норадреналина варьировалась от клетки к клетке и лежала в пределах 1–5 мкМ. Описанный тип дозозависимости Ca^{2+}-ответов на агонисты был

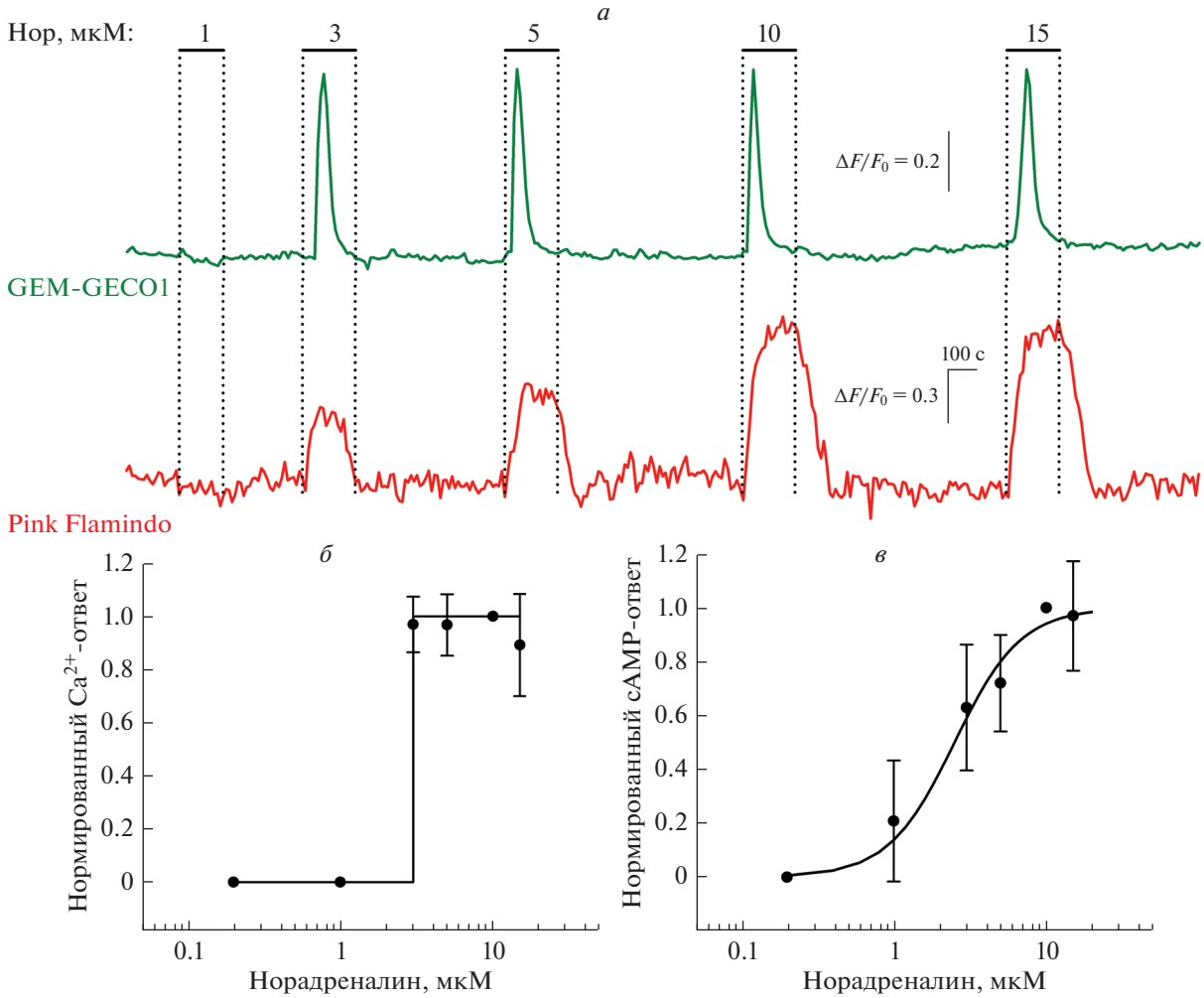

Рис. 1. Ca^{2+}- и cAMP-ответы одиночных клеток HEK 293 на стимуляцию норадреналином в различных концентрациях.

а – Репрезентативная регистрация Ca^{2+}- и cAMP-ответов одиночной клетки HEK 293 на норадреналин (Нор) в различных концентрациях (n = 226). Моменты и продолжительность аппликаций норадреналина обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного Ca^{2+} характеризовали относительной флуоресценцией GEM-GECO1 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F_0 - F$, изменение внутриклеточного cAMP характеризовали относительной флуоресценцией Pink Flamindo $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии индикатора и его эмиссии в начале регистрации соответственно.

б – Дозозависимость Ca^{2+}-ответов клеток HEK 293, характеризующихся одинаковым порогом чувствительности к норадреналину 3 мкМ (n = 14–20). Каждый ответ был нормирован на ответ, вызванный в соответствующей клетке норадреналином в концентрации 10 мкМ. Экспериментальная зависимость (точки) аппроксимирована функцией Хевисайда со скачком в точке 3 мкМ (непрерывная линия). Экспериментальные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

в – Дозозависимость cAMP-ответов на норадреналин клеток HEK 293 (n = 201). Каждый ответ был нормирован на ответ, вызванный в данной клетке 10 мкМ норадреналина. Экспериментальная зависимость (точки) аппроксимирована уравнением Хилла: $R = A^h/(A_{0.5}^h + A^h)$, где R – нормированный клеточный ответ, A – концентрация норадреналина, $A_{0.5}$ – концентрация полуэффекта, h – коэффициент Хилла. Непрерывная линия получена при $h = 2$ и $A_{0.5} = 2.5$ мкМ. Экспериментальные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

обнаружен в МСК в наших предыдущих исследованиях [5, 9, 10]. Результаты этих работ свидетельствовали о том, что ключевым механизмом, обеспечивающим инвариантность формы Ca^{2+}-сигналов, индуцированных агонистами в различных дозах, является Ca^{2+}-индуцированный выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release, CICR). По-видимому, универсальность величины и формы Ca^{2+}-ответов на норадреналин в клетках HEK 293 (рис. 1*а*, верхняя кривая) также обеспечивает CICR. Отметим, что дозозависимость cAMP-ответов клеток HEK 293 носила

совершенно иной характер: пороговая концентрация норадреналина лежала в области 1–3 мкМ, а амплитуда cAMP-ответов росла пропорционально концентрации агониста (рис. 1*а*, нижняя кривая, 1*в*).

Таким образом, использование генетически кодируемых сенсоров Ca^{2+} и cAMP позволило продемонстрировать, что норадреналин способен инициировать в клетках HEK 293 сложный паттерн внутриклеточных событий, стимулируя как минимум мобилизацию Ca^{2+} и генерацию cAMP. Поскольку Ca^{2+}-ответы, инициированные короткими аппликациями норадреналина, были инвариантны по форме при разных дозах агониста, то кодирование информации об интенсивности стимула могло осуществляться на уровне cAMP-сигналов, амплитуда которых зависела от концентрации норадреналина (рис. 1). Скорее всего, клетки, которые генерируют Ca^{2+}-сигналы в ответ на агонисты по принципу “всё или ничего”, например МСК, могут использовать сходную стратегию кодирования внешних стимулов, генерируя не только Ca^{2+}-сигналы, но и сигналы другой природы, например, в форме импульсов cAMP, градуально зависящих от силы стимуляции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guimaraes S., Moura D. 2001. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacol. Rev.* **53** (2), 319–356.
2. Cotecchia S. 2010. The α1-adrenergic receptors: Diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **30**, 410–419.
3. Cottingham C., Chen H., Chen Y., Peng Y., Wang Q. 2011. Genetic variations of α2- adrenergic receptors illuminate the diversity of receptor functions. In: *Advances in adrenergic recept or biology.* Ed. Wang Q. San Diego: Academic Press, p. 162–190.
4. Galaz-Montoya M., Wright S.J., Rodriguez G.J., Lichtarge O., Wensel T.G. 2017. β2-Adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-canonical cAMP-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **292** (24), 9967–9974.
5. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2014. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.
6. Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7** (1), 7351.
7. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science.* **333** (6051), 1888–1891.
8. Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Kanareikina M.A., Kalinina N.I., Sysoeva V.Yu., Dyikanov D.T., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A. 2016. Activation of β-adrenergic receptors is required for elevated α1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* **6**, 32835.
9. Kotova P.D., Bystrova M.F., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Sysoeva V.Yu., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2018. Coupling of P2Y receptors to Ca^{2+} mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
10. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2021. Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells. *BBA Advances.* **1**, 100012.

Responsiveness of HEK 293 Cells to Norepinephrine Analyzed by the On-line Monitoring of Intracellular Ca^{2+} and cAMP

E. N. Kochkina[1, *], O. A. Rogachevskaja[1], P. D. Kotova[1]

[1]*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: kate-kochkina@yandex.ru*

Norepinephrine plays an important role in the regulation of a variety of physiological processes. Cells of various types recognize this hormone by employing adrenergic receptors that can be coupled to the phospholipase and adenylate cyclase signaling pathways. Here we investigated the adrenergic system of HEK 293 cells using genetically encoded sensors GEM-GECO1 and Pink Flamindo for on-line monitoring of intracellular concentrations of Ca^{2+} and cAMP, respectively. We found that in single HEK 293 cells, norepinephrine stimulated both Ca^{2+} signaling and cAMP production. An interesting feature of the cAMP and Ca^{2+} signals was that the magnitude of cAMP responses gradually increased with the dose of norepinephrine, while Ca^{2+} responses exhibited nearly the same magnitude at different agonist concentrations above the threshold value. The physiological significance of such dose dependencies is discussed.

Keywords: adrenergic receptors, norepinephrine, Ca^{2+} signaling, cAMP signaling, genetically encoded sensors

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0233475521060141

В статье Ларюшкина Д.П., Майорова С.А., Гайдина С.Г., Зинченко В.П., Косенкова А.М. “Сравнение эффективности подавления KCl-индуцированных кальциевых ответов гиппокампальных нейронов различными блокаторами потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов L-типа”, опубликованной в журнале “Биологические мембраны”, 2021, т. 38, № 4, с. 284–291, на странице 290 в последнем абзаце основного текста статьи вместо “Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00138” следует читать “Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90063”.