

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 39, номер 1, 2022

---

---

Тематический выпуск “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”

Редактор-составитель В. П. Зинченко

## ОБЗОРЫ

|  |    |
|--|----|
| Гомеостаз кальция в сперматозоидах: механизмы регуляции и биологическая роль<br><i>А. Н. Накиджина, Т. И. Кузьмина</i>   | 3  |
| ***  |    |
| Влияние тромбина на культивируемые астроциты крысы, подвергнутые кислородно-глюкозной депривации<br><i>Е. А. Абрамов, А. Е. Иванова, Э. Б. Дашинимаев, А. Г. Камкин, Л. Р. Горбачева</i>   | 18 |
| Регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода: математическая модель и эксперимент<br><i>В. В. Войнаровский, Г. Г. Мартинович</i>   | 28 |
| Этилметилгидроксипиридина сукцинат индуцирует противовоспалительную поляризацию микроглии в мозге стареющих крыс<br><i>Ю. И. Кирова, Ф. М. Шакова, Т. А. Воронина</i>  | 44 |
| Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону<br><i>В. В. Рощина, А. В. Кучин, А. Р. Куньев, Г. А. Солтани, Л. М. Хайбулаева, Н. К. Призова</i>   | 54 |
| Неканоническое потенцирующее действие каннабиноидов анандамида и 2-арахидоноил-глицерина на вызванную квантовую секрецию ацетилхолина в моторных синапсах мыши<br><i>Е. О. Тарасова, Н. А. Хоткина, П. О. Богачева, К. А. Чернышев, А. Е. Гайдуков, О. П. Балезина</i> | 63 |
| Индукция митохондриальной циклоспорин-зависимой поры ацилкарнитинами. Влияние концентрации и длины углеродной цепи<br><i>Н. И. Федотчева, Е. В. Гришина, В. В. Дынник</i>  | 75 |

---

---

# Contents

---

---

Vol. 39, No. 1, 2022

---

---

## Special Issue *Receptors and Intracellular signaling*

Publication editor, V. P. Zinchenko

### REVIEWS

Calcium Homeostasis in Spermatozoa: Regulatory Mechanisms  
and Biological Significance

*A. N. Nakidkina, T. I. Kuzmina*

3

---

\*\*\*

Effect of Thrombin on Cultured Rat Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation

*E. A. Abramov, A. E. Ivanova, E. B. Dashinimaev,  
A. G. Kamkin, L. R. Gorbacheva*

18

Regulation of the Structural Stability of Erythrocytes by Hydrogen Peroxide:  
Mathematical Model and Experiment

*V. V. Voinarouski, G. G. Martinovich*

28

Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Induces Anti-inflammatory Polarization  
of Microglia in the Aging Rat Brain

*Y. I. Kirova, F. M. Shakova, T. A. Voronina*

44

The Presence of Azulene on the Surface of Plant Cells As a Test for Ozone Sensitivity

*V. V. Roshchina, A. V. Kuchin, A. R. Kunyev, G. A. Soltani,  
L. M. Khaibulaeva, N. K. Prizova*

54

Noncanonical Potentiation of Acetylcholine Evoked Quantal Release Induced  
by Cannabinoids Anandamide- and 2-Arachidonoilglycerole  
in Mouse Motor Synapses

*E. O. Tarasova, N. A. Khotkina, P. O. Bogacheva,  
K. A. Chernyshev, A. E. Gaydukov, O. P. Balezina*

63

Induction of Mitochondrial Cyclosporin-Dependent Permeability Transition Pore  
by Acylcarnitines. Effects of Concentrations and Carbon Chain Length

*N. I. Fedotcheva, E. V. Grishina, V. V. Dynnik*

75

---

---

УДК 576.372

## ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ: МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

© 2022 г. А. Н. Накидкина<sup>а</sup>, \*, Т. И. Кузьмина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФИЦ животноводства – ВИЖ имени Л.К. Эрнста, г. Санкт-Петербург–Пушкин, 196625 Россия

\*e-mail: alena\_boiceva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята к публикации 08.06.2021 г.

Кальций – один из наиболее значимых элементов внутриклеточной сигнализации. Его роль настолько велика и сложна, что позволяет выделить многообразные эффекты и каскады реакций с участием этого иона в отдельную сигнальную систему – кальциевую. Мужские гаметы не стали исключением: более того, невозможность транскрипции и незначительный уровень трансляции сделали посттрансляционные процессы, многие из которых активируются/ингибируются при участии кальция, основным способом регуляции функционирования зрелых сперматозоидов. Повышение внутриклеточного уровня кальция является необходимым этапом капацитации, гиперактивации и акросомной реакции – процессов, предшествующих оплодотворению. Кальций необходим как для прогрессивной, так и для гиперактивированной подвижности; сперматозоиды используют этот ион для предотвращения спонтанной акросомной реакции и, когда приходит время, для обеспечения акросомального экзоцитоза. Такие значительные различия в эффектах воздействия одного и того же иона достигаются сложной системой регуляции и специфической локализацией элементов сигнализации, управляющих притоком и выведением кальция из клетки, а также его белков-мишеней. Не будет преувеличением сказать, что успешное оплодотворение невозможно без исправно функционирующей системы регуляции кальциевого гомеостаза в гамете. В последние годы проведено множество исследований, направленных на прояснение механизмов индукции кальциевых сигналов в сперматозоидах разных видов, а также на анализ внутриклеточных эффектов этих сигналов и их локализацию в пространстве и времени. В данном обзоре мы попытались объединить полученные знания и обозначить вопросы, ответы на которые еще предстоит уточнить.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, кальций, депо, капацитация, акросомная реакция, гиперактивация

**DOI:** 10.31857/S0233475522010078

### 1. ВВЕДЕНИЕ

У сперматозоидов ядро транскрипционно неактивно, уровень трансляции в клетке незначителен, а значит, регуляция функционирования мужских гамет осуществляется главным образом за счет посттрансляционных процессов; скорость их намного выше по сравнению с долгосрочной регуляцией посредством влияния на экспрессию генов, так как достигается путем модификации уже имеющихся в клетке белков и ферментов. Кальциевая сигнализация – неотъемлемая часть системы “быстрой” регуляции функциональной активности сперматозоида; ионы кальция ( $Ca^{2+}$ ) играют ключевую роль в различных посттрансляционных модификациях (фосфорилирование, нитрозилирование и др.) ферментов и других белков, контролируя таким образом их активность [1]. Именно путем изменения внутриклеточного

уровня  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в мужских гаметах индуцируются и регулируются основные постэякуляционные процессы сперматозоида: капацитация, гиперактивация и акросомная реакция (АР). Показано, что у индивидов с нарушениями в кальциевом гомеостазе сперматозоидов наблюдается недостаточность репродуктивной функции, а значит, изучение механизмов осуществления  $Ca^{2+}$ -сигналов важно для понимания и впоследствии для решения проблем, связанных с бесплодием.

### 2. ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЕ

$[Ca^{2+}]_i$  может повышаться двумя путями: притоком из внеклеточного пространства либо из внутриклеточных депо  $Ca^{2+}$  (ВД). И в том, и в дру-

гом случае имеет место поступление  $\text{Ca}^{2+}$  по градиенту концентрации через ионные каналы, что как минимум в 1000 раз быстрее транспорта через ионные обменники и помпы, а значит, позволяет клетке моментально реагировать на меняющиеся условия [2].

### 2.1. Кальциевые каналы наружной цитоплазматической мембраны сперматозоидов

В цитоплазматической мембране (ЦПМ) созревающих и зрелых спермиев млекопитающих в разные годы был обнаружен целый ряд ионных каналов, проницаемых для  $\text{Ca}^{2+}$ , в числе которых потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы ( $\text{Ca}_V$ ), CNG-каналы (cyclic nucleotide-gated – управляемые циклическим нуклеотидом), TRPC-каналы (transient receptor potential canonical channel – канонические каналы кратковременного рецепторного потенциала), а также депо-управляемые каналы (SOC, store operated channel) Orai. Однако за последние два десятилетия получено достаточно свидетельств того, что основную роль в обеспечении притока внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в зрелых сперматозоидах играют каналы CatSper (Cation channel of sperm – катионный канал спермиев). Последние являются наиболее изученными на сегодняшний день  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами мужских гамет. Они были описаны в 2001 г. у мыши как специфичные для сперматозоидов ионные каналы, локализованные в основной части хвостика, являющиеся необходимым элементом cAMP-опосредованного притока  $\text{Ca}^{2+}$ , подвижности и оплодотворения [3]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что эти слабо потенциал-зависимые pH-чувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы – гетеротетрамеры и состоят из четырех основных образующих пору субъединиц, каждая из которых кодируется отдельным геном, и функционирование всех этих генов необходимо для обеспечения фертильности. Также сложную структуру канала формируют вспомогательные субъединицы CatSper $\beta$ , CatSper $\gamma$  и CatSper $\delta$ , кодируемые как минимум 7 генами [4], и другие пока в полной мере не изученные составляющие [2]. Гены CatSper экспрессируются только в яичках в процессе сперматогенеза. У человека было показано, что мутации в генах CatSper1 и CatSper2 вызывают бесплодие у мужчин [4]. Получено множество свидетельств первостепенного значения CatSper-каналов для гиперактивации: хотя сперматозоиды мышей, нокаутных по генам CatSper1–4, проявляют нормальную  $\text{Ca}^{2+}$ -независимую подвижность, мутантные клетки неспособны развить гиперактивацию. Мыши с дефектной CatSper $\delta$  стерильны, а среди бесплодных мужчин встречаются мутации в CatSper1 и 2, однако до настоящего времени не было обнаружено таких пациентов с мутациями CatSper $\beta$  и  $\gamma$ . На

сперматозоидах быков показано, что для развития гиперактивации требуется приток  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцирующийся с ростом pH и, по-видимому, осуществляющийся через CatSper-каналы [5], что подтверждается отсутствием у сперматозоидов мыши pH-индуцированного роста [ $\text{Ca}^{2+}$ ], и способности развить гиперактивированную подвижность при дефектах CatSper1. Тем не менее в экспериментах с тимеросалом на мышях было показано, что даже в среде без  $\text{Ca}^{2+}$  и/или при отсутствии функционирующих CatSper-каналов гиперактивация у 20–40% гамет достигается путем мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД [6]. Позднее на сперматозоидах человека было показано, что вслед за поступлением  $\text{Ca}^{2+}$  через CatSper под воздействием прогестерона, происходит  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR,  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release) ВД в области шейки и мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  из депо необходима для гиперактивации гамет [7]. Недавние исследования свидетельствуют, что поступление  $\text{Ca}^{2+}$  через CatSper, помимо гиперактивации, необходимо для передачи  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала из хвостика на головку, вслед за этим в ней возрастает концентрация NADH, и мыши с дефектными CatSper-каналами демонстрируют более низкий уровень АТФ по сравнению с диким типом. Последнее позволяет предположить, что поступление  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы CatSper может регулировать и гомеостаз АТФ. AP, судя по всему, не требует поступления  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды: щелочная деполяризация и добавление cGMP индуцировали AP у мышей с мутациями (–/–) в генах CatSper1 и 2 [4]. Вызывает интерес тот факт, что CatSper3 и 4 обнаруживаются в области акросомы поздних сперматид и сперматозоидов человека, что свидетельствует о возможной роли этих канальных белков в обеспечении AP мужских гамет человека [8].

Многие аспекты чувствительности CatSper к различным регуляторам отличаются у разных видов, демонстрируя эволюционные расхождения генов этих каналов. Регуляция активности каналов CatSper у человека *in vivo* подразумевает активацию компонентами фолликулярной жидкости, прогестероном и простагландинами, а также ростом внутриклеточного pH [4]. Все эти активаторы присутствуют в женском репродуктивном тракте и являются индукторами и необходимыми условиями гиперактивации и впоследствии AP. Как и у человека, каналы CatSper макаки-резус также демонстрируют чувствительность к прогестерону, однако же опосредованную белками блестящей оболочки (в отличие от CatSper человека, взаимодействующих с прогестероном напрямую) [9]. В то же время показано, что у сперматозоидов мыши каналы CatSper не чувствительны к прогестерону [10]. Аналогично 8-Br-cNMP (8-Br-циклонуклеотидмонофосфат: 8-Br-cAMP и

8-Br-cGMP) активируют каналы CatSper в сперматозоидах человека, но не в мужских гамет мышши [4]. Так как для активации CatSper необходимо защелачивание цитоплазмы, в регуляции активности этих каналов принимают участие также переносчики  $H^+$  и другие ионные каналы: NHE ( $Na^+/H^+$ -обменник),  $H_v1$  (потенциалзависимый  $H^+$ -канал 1),  $SLO3K^+$  (специфичный для спермы  $K^+$ -канал). Каналы  $SLO3K^+$  принимают участие в гиперполяризации ЦПМ сперматозоида при капацитации. На мышшах показано, что активность  $SLO3K^+$  необходима для открытия CatSper, однако же дефектные  $SLO3K^+$  не мешают сперматозоидам успешно завершить другие этапы капацитации [11]. Самцы мышши с мутантными  $SLO3K^+$  и/или CatSper стерильны *in vivo* и демонстрируют значительно сниженную способность к оплодотворению *in vitro* [12]. У человека же показано, что помимо  $SLO3K^+$  в гиперполяризации мембраны участвует другой  $K^+$ -канал, предположительно  $SLO1K^+$  [13].  $SLO1K^+$  был также детектирован в передней части постакросомальной области, средней и основной части хвостика сперматозоидов хряка, в этом же исследовании приведены свидетельства важности этого канала для роста  $[Ca^{2+}]_i$  и акросомного экзоцитоза под воздействием прогестерона [14].  $H_v1$  идентифицирован в хвостике сперматозоидов человека [15], где он может влиять на работу pH-зависимых каналов CatSper и  $SLO3K^+$ . У мышшей же показана роль в приобретении способности к оплодотворению другого пути изменения pH — специфического для спермиев  $Na^+/H^+$ -обменника (sNHE): при отсутствии функционирующего sNHE самцы мышши стерильны [2]. Интересно, что первичная структура sNHE содержит домен связывания циклического нуклеотида: есть основания полагать, что работа обменника регулируется cAMP, концентрация которого повышается на начальных этапах капацитации [2]. Другие регуляторы активности CatSper-каналов — нейромедиаторы, хемокины и одоранты. На сперматозоидах человека показано, что последние способны активировать ток  $Ca^{2+}$  через CatSper, взаимодействуя с каналом напрямую, не вовлекая ни cAMP, ни рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR) [4]. На активность CatSper-каналов способны оказывать влияние и такие гормоны, как прегненолона сульфат, оказывающий схожий с прогестероном эффект, а также тестостерон и гидрокортизон, ингибирующие действие прогестерона. Этими же авторами показано, что стероидоподобные молекулы, в частности, растительные тритерпеноиды пристимерин и лупеол, конкурируют как с прогестероном, так и с прегненолона сульфатом, и значительно снижают активацию CatSper этими соединениями. Более того, исследователи наблюда-

ли снижение гиперактивации капацитированных гамет под воздействием пристимерина и лупеола, что делает растительные тритерпеноиды перспективными контрацептивными средствами [16]. Помимо прочего, на человеке продемонстрировано, что широкий спектр EGC (endocrine disrupting chemicals — веществ, нарушающих работу эндокринной системы), содержащихся в продуктах питания, бытовой химии и косметике, способен преждевременно активировать CatSper-каналы, делая их нечувствительными к воздействию прогестерона и других физиологических активаторов, а значит, нарушая механизм оплодотворения [17].

*2.1.1. Каналы ORAI* (названные в честь хранителей небесных врат в греческой мифологии [18]) — это небольшие белковые молекулы размером 28–33 кДа, расположенные на ЦПМ и образующие каналную пору четырьмя трансмембранными сегментами [19]. Это селективный  $Ca^{2+}$ -канал, открывающийся при опустошении ВД и являющийся частью механизма SOCE (store operated  $Ca^{2+}$  entry — депо-управляемый приток  $Ca^{2+}$ ). В соматических клетках ORAI экспрессируется совместно со STIM (stromal interaction molecule — молекулой стромального взаимодействия), локализованной на мембране хранилищ  $Ca^{2+}$ . STIM реагирует на снижение количества  $Ca^{2+}$  в депо, перемещаясь в сторону, примыкающую к цитоплазматической мембране клетки, где она запускает ORAI или, возможно, один из каналов TRPC. Получены свидетельства присутствия различных изоформ ORAI и STIM в сперматозоидах человека: метод иммуофлуоресценции показал локализацию ORAI1, ORAI2 и STIM2 в области акросомы, средней и основной части хвостика (для ORAI2 свечение антител в хвостике было незначительным), STIM1 — в средней части, с ярким свечением в области шейки, а также ORAI3 — в переднем отделе средней части и в области шейки гамет [20]. Также авторы продемонстрировали, что  $Ca^{2+}$ -сигнал, запущенный CatSper-каналами хвостика, передается на головку при участии ORAI и SOCE. Показано, что прогестерон, активируя CatSper-каналы, запускает бифазный  $Ca^{2+}$ -сигнал, первая фаза которого протекает в передней части хвостика и кратковременна, а за ней следует устойчивый  $Ca^{2+}$ -сигнал в области головки и шейки. В данном исследовании предварительная обработка клеток 2-АФБ (2-аминоэтоксидифенил боратом) в концентрации 5 мкМ или лоперамидом, стимулирующими активность ORAI, в обоих случаях усиливала вторую, устойчивую фазу  $Ca^{2+}$ -сигнала в области шейки/средней части, индуцированного прогестероном [20]. В другой работе показана роль ORAI1 для сперматогенеза мышши, а также продемонстрировано, что самцы с мутациями ORAI1<sup>-/-</sup> стерильны [21].

**2.1.2. TRPC-каналы** – характерные для млекопитающих гомологи семейства TRP,  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемых каналов, обнаруженных у *Drosophila* и участвующих в активации фоторецепторов мухи (за что и получили свое название), регулируемой фосфолипазой C (PLC) [22]. Обычно каналы TRP состоят из 6 трансмембранных доменов, а также расположенных внутри клетки крупных аминок- и карбоксильных концов [23]. В семействе TRPC 7 представителей, и все они экспрессируются в яйцках [24]. Катионные каналы TRPC проницаемы для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  и не потенциал-зависимы, однако являются потенциал-чувствительными: их активность может меняться под воздействием мембранного потенциала [25]. Еще в 2003 г. получены данные о наличии TRPC1, 3, 4 и 6 в зрелых сперматозоидах человека с локализацией TRPC1 в основной части хвостика и в некоторых клетках – в задней части акросомальной области, TRPC3, 4 и 6 – в средней части, помимо этого TRPC3 – в области акросомы, а TRPC6 – точно в основной части хвостика и незначительно – в головке [26]. В данном исследовании также с использованием ингибитора TRPC (SKF96365) продемонстрирована роль этого канала в обеспечении подвижности гамет. Приведены свидетельства присутствия TRPC2 в области акросомы и экваториальном сегменте сперматозоидов мыши и вклада TRPC2 в устойчивый приток  $\text{Ca}^{2+}$  под воздействием белков блестящей оболочки (ZP3) и обеспечение AP. Также показано присутствие TRPC1 и TRPC5 в области акросомы в передней части головки, а также TRPC3 в задней части головки и в основной части хвостика сперматозоидов мыши [27]. Также есть свидетельства, что TRPC, по крайней мере, в некоторых типах клеток, являются депо-управляемыми каналами и активируются как и ORAI при опустошении ВД  $\text{Ca}^{2+}$  [28]. Результаты исследования Lee и соавт. говорят о взаимодействии TRPC, STIM и ORAI, и авторами выдвинуто предположение, что механизм SOC на самом деле может обеспечиваться не отдельными канальными структурами (ORAI или TRPC), а сложным комплексом, в состав которого входят все перечисленные компоненты [29]. В сперматозоидах человека обработка SKF96365, ингибитором TRPC и SOCE, приводит к подавлению хемотаксиса, что говорит о возможной роли TRPC-каналов и SOCE с их участием в обеспечении данного процесса [30].

**2.1.3. Другие TRP-каналы.** Помимо TRPC в сперматозоидах также обнаружены и другие TRP-каналы. Так, показано присутствие каналов TRPM (M – melastatin – меластатин) и TRPV (V – vanilloid – ваниллоид) в сперматозоидах крысы [31], однако их роль до конца не ясна. Vergabò и соавт. в своей работе показали перемещение TRPV1-каналов в процессе капацитации из по-

стакросомальной области в апикальную часть головки сперматозоидов хряка, а также падение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и ингибирование полимеризации актина в области акросомы при обработке клеток капсазепином (антагонистом TRPV1-каналов) [32]. Активация же капсаицином (агонистом TRPV1-каналов) в данном исследовании приводила к деполимеризации мембраны и последующему открытию  $\text{Ca}_v$ -каналов. В недавнем исследовании получены данные, описывающие локализацию TRPV1-каналов в преакросомальной, акросомальной и постакросомальной областях, а также в области хвостика сперматозоидов быка [33]. Авторы привели неоднозначные данные о роли TRPV1 в функционировании гамет: как ингибирование канала капсазепином, так и его активация анандамидом приводили к снижению прямолинейно-поступательной подвижности, а также к индукции гиперактивации и капацитации (что было оценено хлортетрациклиновым тестом). Также получены данные о присутствии каналов TRPM8 в сперматозоидах человека [34]. Этот канал активируется ментолом, а также при понижении температуры; De Blas и соавт. в своей работе показали, что ментол активировал AP гамет, однако этот эффект подавлялся при предварительной обработке капсазепином или ВСТС (еще один ингибитор TRPM8). Аналогичное исследование на мышцах показало схожие результаты с той разницей, что в отличие от сперматозоидов человека, у которых обработка капсазепином и ВСТС не влияла на активацию AP прогестероном и ZP3, у мышши ингибирование TRPM8 приводило к значительному подавлению AP под воздействием указанных физиологических индукторов [35].

**2.1.4. CNG-каналы** – это неселективные катионные каналы, обнаруженные в ЦПМ различных типов клеток. Они активируются при связывании циклического нуклеотида (сAMP или сGMP), обладают низкой ионной селективностью и являются слабо потенциал-зависимыми [19]. Хотя первым выделенным из яйцек мышши ионным каналом спермиев стал именно CNG, долгое время его участие в обеспечении функционирования зрелых мужских гамет ставилось под сомнение [19] и на сегодняшний день роль CNG до конца не ясна. Показана высокая селективность к  $\text{Ca}^{2+}$  у CNG сперматозоидов мышши, а также вклад данного канала в поступление внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль гамет и обеспечение капацитации. Авторы продемонстрировали, что циклические нуклеотиды (использовались их аналоги – 8Br-cAMP и 8Br-cGMP) способны увеличивать макроскопические ионные токи у сперматозоидов мышши. Ингибирование же CNG значительно снижало сGMP-индуцированный вход  $\text{Ca}^{2+}$  и капацитацию мужских гамет [36].

**2.1.5.  $Ca_v$ -каналы.** Роль потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов ( $Ca_v$ ) в сперматозоидах на сегодняшний день широко обсуждается [37]. Белковые структуры и мРНК  $Ca_v$ -каналов были обнаружены в сперматозоидах многих видов млекопитающих, а также было показано, что  $Ca_v3$ -каналы функционируют в сперматогониях мыши и человека [38] и в тестикулярных спермиях мыши [39]. Показано, что в некапацитированных эпидидимальных сперматозоидах мыши функционируют как минимум 2  $Ca_v$ -канала: согласно полученным Wennemuth и соавт. данным, наиболее вероятно, что это  $Ca_v2.2$  и  $Ca_v2.3$  [40]. Интересно, что сперматозоиды мыши с дефектным  $Ca_v2.3$ , помимо снижения  $[Ca^{2+}]_i$  в области головки под воздействием  $\alpha$ -D-манноза-БСА (БСА – бычий сывороточный альбумин), демонстрируют большую скорость и линейность движения по сравнению с диким типом [41]. Выдвинуто предположение, что  $Ca_v1$ - и  $Ca_v2$ -каналы имеют значение для АР мужских гамет человека, т.к. было показано, что часть притока  $Ca^{2+}$ , необходимого для этого процесса, происходит через них [42]. Однако нокаутные по генам  $Ca_v3.1$  и  $Ca_v3.2$  (гены  $Ca_v3$ -канала) мыши обладают нормальной фертильностью [43], и в эпидидимальной сперме не было обнаружено функционирующих  $Ca_v$ -каналов. Тем не менее, в более позднем исследовании на мышах получены свидетельства в пользу обратного: мыши с дефектным  $Ca_v3.2$  демонстрировали измененный  $Ca^{2+}$ -сигнал, сниженную способность к АР и процент успешного IVF (субфертильный фенотип). При блокировании  $Ca_v3.2$  у дикого типа (использовался SNX-482) наблюдалось значительное подавление АР, индуцированной холерным токсином В или ганглиозидом GM1: авторы показали, что мембранные перестройки, такие как выход холестерина и локальное повышение концентрации GM1, модулируют АР посредством влияния на активность  $Ca_v3.2$ -каналов [44].

## 2.2. Кальциевые каналы внутриклеточных депо сперматозоидов

Поступление  $Ca^{2+}$  из ВД не менее важно для реализации необходимых для оплодотворения процессов, чем вход этого иона извне. Показано участие мобилизации депонированного  $Ca^{2+}$  в капацитации, АР [45, 46] и гиперактивации [6, 7, 47], а термотаксис (вид хемотаксиса, движение гамет в сторону более высокой температуры) и вовсе регулируется исключительно  $Ca^{2+}$ -сигналами, генерируемыми внутриклеточными хранилищами [48]. Наиболее распространенными среди различных типов клеток млекопитающих  $Ca^{2+}$ -каналами являются инозитол-1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ )-чувствительный  $Ca^{2+}$ -канал (или  $IP_3$ -рецептор,  $IP_3R$ ) и

рианодин-чувствительный  $Ca^{2+}$ -канал (или  $Ry$ -рецептор,  $RyR$ ), локализующиеся преимущественно на мембране эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума (ЭР). Несмотря на разницу в массе (около 260–310 кДа для  $IP_3R$  и 565 кДа для  $RyR$ ), эти каналы, в особенности их трансмембранный домен, имеют участки со схожими последовательностями, что обуславливает способность к взаимодействию с одними и теми же соединениями, однако же с разным, иногда противоположным эффектом. Оба канала активируются и ингибируются  $Ca^{2+}$ : показана колоколообразная зависимость активности  $IP_3R$  и  $RyR$  от  $[Ca^{2+}]_i$ , причем максимальная вероятность открытия канала наблюдается при концентрации свободного  $Ca^{2+}$ : 0.2 мкМ для  $IP_3R$  и 1–100 мкМ для  $RyR$  [49].

**2.2.1.  $IP_3$ -рецептор** – это белковый комплекс, состоящий из 8 трансмембранных доменов, а также имеющий сайты связывания  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$  и АТР, и остатки Ser, фосфорилируемые протеинкиназой А (РКА) и протеинкиназой G (РКГ) [50]. В соматических невозбудимых клетках  $IP_3R$  локализуется преимущественно на мембране ЭР, комплекса Гольджи и на ядерной оболочке [51]. Несмотря на отсутствие ЭР и комплекса Гольджи в зрелых сперматозоидах, подтверждено наличие  $IP_3R$  в мужских гаметах многих видов млекопитающих с преимущественной локализацией в области акросомы, шейки и, иногда – средней части [52]. Показана роль  $IP_3R$ , находящихся на мембране акросомы, в индукции АР мужских гамет млекопитающих [46]. Интересно, что, как показано на сперматозоидах человека, экспрессия  $IP_3R1$  значительно снижается после АР, тогда как экспрессия  $IP_3R3$  не меняется, что может свидетельствовать о роли данного канала в следующих за АР событиях. Помимо акросомы,  $IP_3R$  присутствует в области шейки – на избыточной ядерной мембране (RNE, redundant nuclear envelope), которая расположена вблизи аксонемы, и есть свидетельства участия  $IP_3R$  в гиперактивации [53]. Исследования на соматических клетках показали, что одной из функций  $IP_3R$  является передача ионов  $Ca^{2+}$  митохондриям (МХ) и этот процесс необходим для обеспечения митохондриального дыхания и регуляции апоптоза [54]. Вкупе с данными о повышении  $[Ca^{2+}]_i$  под воздействием разобщителей митохондриального дыхания (2,4-динитрофенола и карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразона; как известно, для работы митохондриального  $Ca^{2+}$ -унипортера (MCU) необходим высокий мембранный потенциал), упомянутыми Sorgeia и соавт. [1], все вышесказанное позволяет предположить, что передача  $Ca^{2+}$  МХ с участием  $IP_3R$  имеет функциональное значение и для сперматозоидов.

Мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{IP}_3\text{R}$  запускается активацией рецептора на ЦПМ, что приводит к образованию  $\text{IP}_3$ , который, в свою очередь, образуется путем гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата ( $\text{PIP}_2$ ) PLC. Для открытия  $\text{IP}_3$ -чувствительного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала необходим  $\text{Ca}^{2+}$  как соантагонист [50]. Также на активность канала может оказывать влияние множество белков, модулирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы активацией или ингибированием  $\text{IP}_3\text{R}$  [51]. При опустошении ВД  $\text{IP}_3\text{R}$  активирует SOC [1], и таким образом,  $\text{IP}_3\text{R}$  сперматозоида, объем хранилищ  $\text{Ca}^{2+}$  которого невелик, может обеспечивать устойчивый приток  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль.

**2.2.2. Ry-рецептор.** Другой переносчик  $\text{Ca}^{2+}$  соматических клеток – Ry-рецептор (RyR) –  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, названный так из-за чувствительности к алкалоиду рианодину. Присутствие и роль RyR в сперматозоидах изучено не так хорошо, как  $\text{IP}_3\text{R}$ . Однако получены свидетельства наличия RyR в области шейки, средней части и, менее выражено, в области акросомы сперматозоидов человека: были идентифицированы RyR1 и 2 в области шейки [55], есть данные о наличии RyR3 в зрелых сперматозоидах мыши, и исследование 2013 г. детектировало RyR в области акросомы [56]. Тем не менее, есть работы, в которых RyR не был обнаружен в зрелых мужских гаметах [52]. *In vivo* RyR активируется непосредственно  $\text{Ca}^{2+}$  по механизму CICR, причем его активация возможна в более широком диапазоне концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ , чем для  $\text{IP}_3\text{R}$  [50]. Еще один физиологический активатор RyR – вторичный посредник сADP-рибоза, синтезирующаяся из NAD при участии фермента ADP-рибозилциклазы (CD-38) [1]. Park и соавт. продемонстрировали, что RyR и CD-38 включаются в состав зрелых сперматозоидов в процессе смешивания с секретом простаты, тогда как CatSper-каналы присутствуют в зрелых спермиях изначально [57].

На работу как  $\text{IP}_3\text{R}$ , так и RyR влияют активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА), окисляя специфические сайты с цистеиновыми радикалами [1]. АФК обладают как прямым активирующим воздействием на RyR1, усиливая взаимодействие субъединиц канала, так и непрямым – блокируя связывание с  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулином и апокальмодулином; в свою очередь, оксид азота (NO) блокирует прямое действие АФК, а также снижает эффективность апокальмодулина. В случае с  $\text{IP}_3\text{R}$  процесс несколько усложняется: низкий уровень окисления цистеина сенсibiliзирует канал, тогда как усиление оксидативного воздействия при обработке высокими дозами тимеросала ингибирует активность  $\text{IP}_3\text{R}$ . Активность  $\text{IP}_3\text{R}$  и RyR регулируется различными киназами, такими как PKA, PKG, кальмоду-

лин-зависимая протеинкиназа II (CaMK II), протеинкиназа B (AKT), а также некоторыми тирозинкиназами [1]. Также показано, что в сперматозоидах человека обмен GDP на GTP в соответствующем домене Rap из семейства малых GTP-аз обеспечивает акросомальный экзоцитоз. При этом биологическая роль такого обмена заключается в мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -чувствительных ВД [58]. В недавних исследованиях был изучен механизм данного процесса: активация Eras (фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, активируемый cAMP) в присутствии cAMP приводит к обмену GDP на GTP в малой GTP-азе Rap1, что вызывает активацию PLC с образованием  $\text{IP}_3$  и последующей мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из акросомы. Также cAMP активирует малые GTP-азы Rab3 и 27, завершающие экзоцитозный каскад [59]. В подтверждение полученных данных другая группа ученых продемонстрировала, что малая GTP-аза Rab3 может иметь различное влияние на акросомальный экзоцитоз в зависимости от типа связанного ею гуанинового нуклеотида, и гидролиз GTP на Rab3 необходим для завершения последних этапов AP [60]. В исследованиях Ghosh и соавт. были получены свидетельства существования переходов  $\text{Ca}^{2+}$  между ВД различных типов, активируемые GTP [61]. Авторы впервые экспериментально продемонстрировали разнонаправленное действие GTP на клетках нейробластомы и гладких мышц: GTP мобилизовал  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД, однако в присутствии оксалата (способного стимулировать депонирование  $\text{Ca}^{2+}$ ) после быстрого периода мобилизации GTP стимулировал уже приток  $\text{Ca}^{2+}$  во ВД. Согласно гипотезе Ghosh и соавт., GTP опосредует процесс образования связи между двумя типами ВД – рианодин- и  $\text{IP}_3$ -чувствительными и обеспечивает переход  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин- в  $\text{IP}_3$ -чувствительные ВД. При совместном действии GTP и  $\text{IP}_3$  в клетках отмечается дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД, что свидетельствует о перемещении  $\text{Ca}^{2+}$  между депо. Нами также показано наличие взаимодействия между  $\text{IP}_3$ -чувствительными и  $\text{IP}_3$ -нечувствительными (предположительно, Ry-чувствительными) депо  $\text{Ca}^{2+}$  в процессе капацитации и AP [45]. В первом случае в образование связи депо вовлечен фибриллярный актин (F-актин) и ПКА: ингибирование полимеризации микрофиламентов цитохалазином D, также как и обработка ингибитором ПКА соединением H-89, подавляло как дополнительную мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  при воздействии теофиллина (повышающего уровень cAMP в клетке) в паре с GTP, так и стимулированную данной парой реагентов капацитацию. Можно предположить, что после мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД в области RNE, происходит перемещение мембранных пузырьков, несущих  $\text{Ca}^{2+}$  в область

акросомы, с помощью актин-зависимого транспорта, основанного на полимеризации актина [62], с последующим слиянием мембраны пузырьков с мембраной акросомы. Вероятно,  $\text{Ca}^{2+}$  транспортируется связанным с кальретикулином, и в составе мембраны цитоплазматических пузырьков присутствует  $\text{PIP}_2$  — предшественник  $\text{IP}_3$  и диацилглицерола (ДАГ), помимо прочего необходимый для инактивации гельсолина (белка, разрезающего F-актин); косвенным подтверждением этому является тот факт, что для полимеризации актина в области головки необходим  $\text{Ca}^{2+}$  и СаМК II [63], т.е. все перечисленные участники процесса могут перемещаться в область акросомы совместно. В случае же с АР было обнаружено, что в образовании связи депо под воздействием пары пролактин/ГТР участвуют микротрубочки и протеинкиназа С (PKC): дополнительное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  и стимуляция АР подавлялись при предварительной обработке нокодазолом (ингибитор полимеризации микротрубочек) и ингибитором PKC Ro 31-8220 [45]. Мы предполагаем, что в процессе капацитации сперматозоидов млекопитающих после высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из RyR, активируется  $\text{IP}_3\text{R}$  и в присутствии GDP происходит перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -чувствительных в  $\text{IP}_3$ -нечувствительные ВД. Также согласно нашей гипотезе, в процессе АР наблюдается обратный процесс: после активации  $\text{IP}_3\text{R}$  в присутствии уже ГТР наблюдается транзит  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -нечувствительных в  $\text{IP}_3$ -чувствительные депо  $\text{Ca}^{2+}$ . Возможно, именно таким образом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал передается с хвостика на головку на начальных этапах капацитации; помимо этого, перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  между депо может быть необходимо в сперматозоиде, где несмотря на малый объем цитоплазмы и относительно большую продолжительность повышения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , клетка должна осуществлять точно локализованные  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированные реакции, а также избегать перегрузки  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ и, соответственно, индукции апоптоза.

### 3. ВЫВЕДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ИЗ КЛЕТКИ

В поддержание низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле эукариотических клеток основной вклад вносят  $\text{Ca}^{2+}$ -насосы, или помпы, осуществляющие перенос ионов против электрохимического градиента с затратой энергии гидролиза АТФ. Такие переносчики, называемые  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азами, расположены как в наружной цитоплазматической мембране — РМСА (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase), так и в мембране органелл, выполняющих функции ВД  $\text{Ca}^{2+}$  — SERCA (sarcoplasmic—endoplasmic reticulum ATPase) и SPCA (secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). Следует заметить, что

названия переносчиков отражают правило, из которого бывают и исключения: например, у растений аналог SERCA встречается и в плазмалемме, и наоборот, характерная локализация РМСА — цитоплазматические вакуоли. Все 3 типа  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз относятся к Р-типу (P — phosphorylation), для которого характерно изменение конформации E1—E2 с образованием временно фосфорилированного промежуточного состояния ( $2 \text{Ca}^{2+}\text{E1P} \rightarrow 2 \text{Ca}^{2+}\text{E2P}$ ), необходимого для переноса  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану [64]. Все АТФ-азы данного типа состоят из 10 трансмембранных и 3 цитоплазматических доменов: связывания АТФ, фосфорилирования и домена, необходимого для перестройки трансмембранных спиралей при транспорте  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 3.1. Кальциевые АТФ-азы ЦПМ сперматозоида

РМСА отличается от других представителей Р-типа АТФ-аз наличием домена связывания кальмодулина (CaM) и в связи с этим большей молекулярной массой (130—140 кДа). Кальмодулин увеличивает сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  и максимальную скорость реакции, являясь, таким образом, активатором исходящего тока  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоиде. Из порядка двенадцати сплайсинговых вариантов РМСА в спермиях крысы и мыши обнаружена в основном РМСА4 — 90% от общего количества с локализацией в основной части хвостика. На мышцах показано, что именно РМСА является основным путем удаления  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля сперматозоидов [65]. При этом мутантные по гену РМСА4 мыши демонстрируют бесплодие у самцов [66]. Было также обнаружено, что механизм бесплодия в данном случае связан с неспособностью клеток эффективно снижать уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле: у мутантных по гену РМСА4 мышей наблюдали уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в покое, равный 370 нМ (вместо 157 нМ у дикого типа), а также значительно сниженную способность к гиперактивации. В исследовании на быках с применением количественного ПЦР-теста было показано, что из двух форм РМСА4 основным сплайсинговым вариантом в яичке, головке и теле придатка является РМСА4b, тогда как в каудальной части эпидидимиса выделяется в основном более активная в отношении транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  РМСА4а [67]. Предполагают, что смена изоформы при переходе спермиев в хвостик придатка говорит о возрастающей потребности в активном транспорте  $\text{Ca}^{2+}$  после попадания в женские половые пути. В исследованиях на спермиях человека показано присутствие РМСА4 в области акросомы, ее внутренней мембраны, а также в задней части головки, шейке, средней части и проксимальном отделе основной части хвостика. Авторы также продемонстрировали совместную локализацию и даже ассоциацию РМСА4 с NO-синтазами, в особенности в капацитиро-

ванных спермиях с повышенным уровнем  $\text{Ca}^{2+}$ . Метод коиммунопреципитации показал наличие комплексов с  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимыми серинкиназами (CASK), PMCA4 и NO-синтазами в протасомах семенной плазмы, откуда, по-видимому, эти комплексы попадают в сперматозоиды [66]. Существование таких комплексов говорит о роли PMCA4 в негативной регуляции активности NO-синтазы сперматозоида (активирующихся при повышении уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле), что уже было показано на моделях клеток эмбриональной почки HEK293 и нейробластомы Neuro-2a мыши. Помимо вышеупомянутого на клетках HEK293 получены данные о взаимодействии PMCA4 с сигнальным путем Ras через рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), а значит, вполне вероятно наличие такого взаимодействия и в сперматозоидах, так как показано присутствие в мужских гаметах EGFR. В сперматозоидах человека запуск фосфорилирования белков по тирозину *in vivo* происходит помимо пути cAMP/киназной индукции, также при взаимодействии лигандов с рецепторами ЦПМ [68]. Рецепторные киназы, какой является и EGFR, стимулируют фосфорилирование белков по тирозину через каскад Ras-Raf-MEK-ERK-MAP (Ras – мембраносвязанные белки, малые GTP-азы; Raf – серин/треонин-специфичные протеинкиназы; MEK – протеинкиназа, фосфорилирующая MAP) [69]. Таким образом, можно предположить вовлечение PMCA4 в регуляцию фосфорилирования белков по тирозину в процессе капацитации.

Другой группой исследователей было продемонстрировано, что для поддержания  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза в сперматозоидах мыши также необходим баланс между JAM-A (Junctional adhesion molecule-A – соединительной молекулой адгезии A) и PMCA4b: показано, что взаимодействие CASK и PMCA4b приводит к инактивации АТФ-азы, тогда как JAM-A косвенно осуществляет положительную регуляцию помпы, также связывая CASK. У мышей с дефективной JAM-A наблюдались значительная недостаточность как прогрессивной, так и, в особенности, гиперактивированной подвижности, электронно-плотные конденсированные МХ и гистопатологический фенотип, повторяющий таковой у мышей с недостаточностью PMCA4b. Исходя из этого, авторы сделали вывод, что при недостаточности JAM-A происходит нарушение оттока  $\text{Ca}^{2+}$  вовне через PMCA4b, а также наблюдается абнормальная секестрация  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями [70].

Еще одним возможным для сперматозоидов путем регуляции активности PMCA4b является РКС, способная частично активировать PMCA4b, снимая ингибирование помпы фосфорилированием в области из 20 остатков ниже кальмодулинсвязывающего домена. Однако, кальмодулин ак-

тивирует АТФ-азу более эффективно, снимая ингибирование сразу в 2 областях, независимо от сайта ингибирования, фосфорилируемого РКС [71].

### 3.2. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник

Помимо PMCA, являющейся основным путем вывода  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточное пространство для невозбудимых клеток, в сперматозоидах присутствует также и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX). Этот переносчик выводит одну молекулу  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента, одновременно поставляя 3 молекулы натрия ( $\text{Na}^+$ ) в цитозоль за счет энергии электрохимического градиента. NCX может также и поставлять  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку при деполяризации мембраны, либо при недостатке натрия во внеклеточной среде [65]. Есть 2 семейства данного переносчика: NCX и  $\text{K}^+$ -зависимый NCX – NCKX. Показано наличие NCX как в эпидидимальных, так и в эякулированных спермиях быков, причем наблюдались различия в активности переносчика: в эпидидимальных сперматозоидах NCX врез со своей прямой функцией транспортировал ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль, а в эякулированных гаметах активность обменника была подавлена белком семенной плазмы. В яичках крысы были обнаружены NCX1.3 и NCX1.7 – 2 сплайсинговых варианта NCX1, а также были получены свидетельства присутствия NCKX3 в яичках мыши. Также на мышцах были получены данные о роли NCX в удалении  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля при повышении его концентрации, однако же вклад NCX был значительно меньше, чем у PMCA и, предположительно, роль обменника заключается в большей степени в обратном транспорте  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль при его низких уровнях [65].

Также NCX присутствует в мембране в области акросомы и средней части сперматозоидов человека, и было показано, что при его ингибировании (использовался бепридил, 3',4'-дихлорбензамил гидрохлорид и KB-R7943) происходит повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и значительное подавление подвижности спермиев [72]. Позже другой группой ученых было продемонстрировано, что инкубация спермиев как с ингибитором NCX KB-R7943, так и с ингибитором PMCA эозином приводит к ухудшению всех показателей подвижности CASA (Computer-assisted sperm analysis), тогда как при ингибировании  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы происходит снижение только показателей прямолинейно-поступательного движения [73].

### 3.3. Кальциевые АТФ-азы внутриклеточных депо

Для восполнения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  ВД и ограничения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов служат внутриклеточные  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы – SERCA и SPCA, и их роль в функ-

ционировании зрелых сперматозоидов млекопитающих в данный момент широко обсуждается [1]. Главным переносчиком  $\text{Ca}^{2+}$  в соматических клетках, транспортирующим этот ион из цитозоля во ВД, является SERCA, и есть данные о ее локализации на везикулах ЭР как с  $\text{IP}_3\text{R}$ , так и с  $\text{RyR}$ . Имеются также свидетельства присутствия аналогичных, а возможно и идентичных SERCA АТФ-аз на наружной ядерной мембране клеток печени крысы. Структура внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы во многом схожа с таковой у PMCA, за тем отличием, что у SERCA отсутствует домен связывания кальмодулина [50], что, по всей видимости, способствует дифференциации помп по механизму регуляции их активности. У млекопитающих SERCA существует в 3 изоформах (SERCA1, SERCA2 и SERCA3), у каждой из которых, в свою очередь, имеется множество различных сплайсинговых форм, отличающихся по размеру белка и его регуляторным свойствам [74]. Наиболее распространенной изоформой является SERCA2, которая присутствует почти во всех типах клеток [1], в том числе и в сперматозоидах: показано наличие SERCA2 в зрелых сперматозоидах мыши, быка и человека. В том же исследовании с помощью метода вестерн-блот были получены данные о наличии в мужских гаметах как минимум 2 изоформ SERCA2, одна из которых локализована в области наружной мембраны акросомы, вторая – в средней части спермия. Активность SERCA может меняться под воздействием окислительного стресса, причем эффект может быть как стимулирующим, так и ингибирующим, в зависимости от окисляемого цистеинового остатка [75]. Интересно, что в яичках мыши показана экспрессия фосфоламбана – мышечно-ингибитора SERCA2, и приведены свидетельства снижения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматиде при накоплении этого белка, что может вести к нарушению дифференцировки и функционирования будущих гамет [76].

Другой внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -помпой, удаляющей  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля во ВД соматических клеток, является SPCA. SPCA существует в 2 изоформах: SPCA1 и SPCA2, причем SPCA1 распространена в значительно большей степени. Характерной локализацией SPCA является аппарат Гольджи. Есть свидетельства наличия у сперматозоидов человека SPCA1, которая преимущественно локализована в области шейки спермия, где находится RNE и мембранные пузырьки, содержащие кальретикулин [77]. Интересно, что в сперматозоидах морского ежа иммунофлуоресценция показала локализацию SPCA в области МХ [78].

#### 4. СЕКВЕСТРАЦИЯ КАЛЬЦИЯ МИТОХОНДРИЯМИ

Долгое время МХ рассматривались как основные  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующие органеллы клетки. Перенос  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс осуществляется через MCU, расположенный на внутренней мембране. Выявлена природа MCU, как селективного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала с чрезвычайно высокой аффинностью к  $\text{Ca}^{2+}$  [79]. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  транспортируются через MCU по градиенту потенциала, образующегося на мембране в процессе нормального функционирования МХ. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондриального матрикса осуществляется через переносчик, высвобождающий  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль в обмен на  $\text{H}^+$  или  $\text{Na}^+$  – NCX. В 2010 г. было выявлено, что представитель семейства NCX – NCLX ( $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{Ca}^{2+}$ -обменник – локализуется в кристах МХ и является основным  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортером этих органелл [80].

Показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  начинает закачиваться в матрикс МХ при повышении  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в покое (то есть без сигналов его длительного повышения [81]), что стимулирует синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования. И действительно, на сперматозоидах мыши показано, что вклад МХ в буферизацию  $\text{Ca}^{2+}$  повышался при ингибировании мембранных  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз, что приводило к росту  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  покоя [65]. Поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  МХ имеет значительный эффект на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы соматических клеток, уменьшая их амплитуду и продолжительность, причем конкретная «форма» этого влияния в каждом типе клеток выражена по-своему [81]. Таким путем избегается  $\text{Ca}^{2+}$ -активированный выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД. Локализация МХ в средней части зрелых сперматозоидов вполне позволяет осуществлять модуляцию  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов таким образом: рядом с МХ в гамете находится мембранный вырост, образованный в результате конденсации хроматина, – RNE, несущая на себе, по разным данным,  $\text{RyR}$  и  $\text{IP}_3\text{R}$ . Однако в сперматозоидах быков при мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД в области хвостика, которым признана RNE, не наблюдалось усиления синтеза АТФ, что говорит об отсутствии в данном случае участия МХ в распространении  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала [47]. В том же исследовании показано, что при ингибировании NCX МХ гиперактивация, стимулированная тапсигаргином (специфическим ингибитором SERCA), не подавлялась. Получены данные в пользу того, что в сперматозоидах человека МХ не оказывают влияния на колебания  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванные активацией ВД в области шейки под воздействием NO и прогестерона. Авторы привели данные, согласно которым в гаметах с разобленным митохондриальным дыханием, предварительно обработанным NO (активирующим мо-

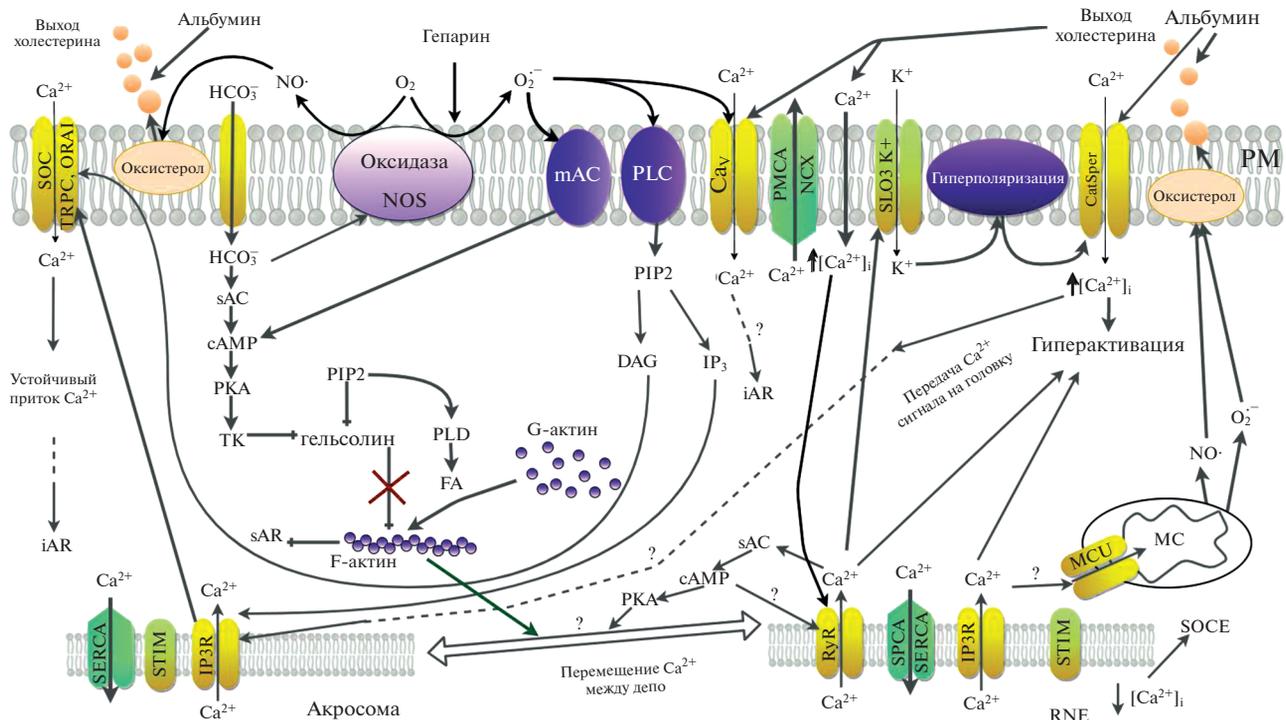
биллизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо), после добавления дитиотреитола (соединения, эффективно устраняющего эффекты S-нитрозилирования)  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  возвращалась в норму аналогично тому, как это происходило в клетках с интактными МХ [82]. По всей видимости, в сперматозоидах необходима возможность поддерживать более длительные и интенсивные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы с участием ВД. Также не стоит забывать и о том, что при “перегрузке” МХ кальцием в них образуются  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые поры, увеличивающие проницаемость мембраны (МРТР – mitochondrial permeability transition pore), что ведет к индукции апоптоза [81]. Возможно, для зрелых сперматозоидов, все постэякуляционные процессы в которых сопровождаются  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналами, такой сценарий является весьма вероятным и не менее нежелательным, а значит, “исключение” МХ из цепочки регуляции колебаний  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  может иметь адаптивное значение.

## 5. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДЕ

Роль  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации во всех типах клеток сложно переоценить: дефекты в ее ключевых элементах зачастую приводят к тяжелым патологиям и значительным нарушениям функционирования клеток, в том числе и половых. В сперматозоидах  $\text{Ca}^{2+}$  принимает участие во всех постэякуляционных процессах, включая оплодотворение. В цитоплазме спермиев поддерживается очень низкая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , а за счет ее повышения осуществляется регуляция посттрансляционных модификаций белков.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  может повышаться посредством притока этого иона извне через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы наружной ЦПМ, либо посредством мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из ВД, где концентрация иона до 4 раз выше в сравнении с цитоплазмой.

Показана роль колебаний  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в обеспечении подвижности и хемотаксиса сперматозоидов [83]. В аксонеме есть сайты связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , регулирующие изгиб хвостика посредством модуляции динеин-зависимого скольжения, и в процесс вовлечены кальмодулин и СаМК II [2]. Когда сперматозоиды покидают семенную жидкость и проходят цервикальную слизь, в гаметках начинают происходить биохимические изменения, необходимые для приобретения способности к АР и оплодотворению и называемые капациацией. Эти изменения включают внутриклеточную модуляцию концентрации ионов, алкализацию цитоплазмы, перестройку липидного состава ЦПМ и ее гиперполяризацию, повышение активности РКА и фосфорилирование белков по тирозину, а также полимеризацию актина. Показано,

что в процессе капациации (рис. 1) происходит повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  путем поступления  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточного пространства через каналы CatSper под воздействием способствующих капациации агентов (таких как  $\text{HCO}_3^-$  и БСА) [84]. При этом в субпопуляции гамет исследователи наблюдали быстрый рост  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  уже после 1 мин инкубации. Поступающий  $\text{Ca}^{2+}$  совместно с  $\text{HCO}_3^-$  активирует растворимую аденилатциклазу (рАЦ) спермия [4], за чем следует активация РКА и последующий каскад реакций с участием данного фермента, являющийся неотъемлемой частью капациации. Помимо этого,  $\text{Ca}^{2+}$  необходим для другого необходимого атрибута капациации – полимеризации актина. Связываясь с кальмодулином,  $\text{Ca}^{2+}$  активирует СаМК II, и у человека показано, что данный фермент опосредует образование F-актина в области головки, что, в свою очередь, предотвращает преждевременную АР; способность СаМК II ингибировать спонтанную АР показана также у быка и мыши [63]. У человека и мыши получены данные, говорящие о значении полимеризации актина в области хвостика для гиперактивации. Известно, что гиперактивация запускается подъемом концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в области хвостика; этот ион усиливает изгиб жгутика в одну из сторон, в результате чего меняется характер движений с симметричного на асимметричный [6]. Для поддержания гиперактивированной подвижности необходим внеклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ , однако есть свидетельства, что в индукцию гиперактивации вовлекается также  $\text{Ca}^{2+}$  ВД. Показано, что мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  из RNE и мембранных пузырьков в области шейки регулирует активность хвостика и участвует в гиперактивации, причем стимулированный тимеросалом выход  $\text{Ca}^{2+}$  из этих депо приводит к гиперактивации части спермиев мыши [6] и человека [7] даже при отсутствии внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и/или функционирующих CatSper-каналов. На последующих этапах капациации  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в области головки растет, происходит деполимеризация актина и становится возможной АР. Экзоцитоз акросомальных ферментов, происходящий после слияния наружной мембраны акросомы и плазмалеммы, является необходимым этапом для преодоления оболочек яйцеклетки. Участие мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из акросомы и SOCE в процессе индукции АР показано у мышей. Показано, что мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$ -депо необходима для запуска АР и является ее ключевым этапом [58]. Физиологические индукторы АР, такие как ZP3 и прогестерон, индуцируют приток  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы CatSper, вследствие чего происходит активация PLC, катализирующей образование  $\text{IP}_3$  и диацилглицерина: первый активирует  $\text{IP}_3\text{R}$  на наружной мембра-



**Рис. 1.** Упрощенная модель  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализации в постэякуляционных процессах сперматозоидов млекопитающих. На начальных этапах капацитации происходит поступление в цитоплазму ионов гидрокарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) и рост pH, что необходимо для активации растворимой аденилатциклазы (sAC), а также открытия каналов CatSper. Другим ранним событием является генерация активных форм кислорода и азота (АФК и АФА) мембранной оксидазой/NO-синтазой (NOS; в настоящий момент точно не идентифицирована) и/или эндогенно (главным образом митохондриями (MC)). АФК окисляют холестерин с образованием оксистеролов, которые при контакте с альбуминами внеклеточного пространства покидают ЦПМ (PM), повышая ее текучесть и проницаемость. Помимо этого, супероксидный анион ( $\text{O}_2^-$ ) способен активировать мембранную аденилатциклазу (mAC), потенциалзависимый  $\text{Ca}^{2+}$ -канал ( $\text{Ca}_v$ ), а также фосфолипазу C (PLC); также АФК и АФА модулируют активность  $\text{IP}_3$ -чувствительного и рианодин-чувствительного  $\text{Ca}^{2+}$  каналов ( $\text{IP}_3\text{R}$  и  $\text{RyR}$ ). По-видимому, незначительное повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на ранних этапах капацитации приводит к активации  $\text{RyR}$ , находящегося в области избыточной ядерной мембраны (RNE, redundant nuclear envelope), а мобилизованный из депо  $\text{Ca}^{2+}$  активирует специфичный для спермиев калиевый канал ( $\text{SLO3K}^+$ ), участвующий в гиперполяризации мембраны, что также необходимо для активации CatSper и индукции гиперактивации. Возможно, ВД участвуют в индукции гиперактивации и напрямую, однако механизм данной взаимосвязи еще предстоит прояснить. Зашелачивание цитоплазмы также активирует растворимую аденилатциклазу (sAC), запуская сигнальный каскад сAMP/РКА/ТК. РКА (протеинкиназа А) и ТК (тирозинкиназа) имеют множество субстратов, однако одним из важнейших является гельсолин – белок, который в активированном состоянии разрезает F-актин. Инактивация гельсолина фосфорилированием по тирозину совместно с активацией PLD (фосфолипазы D) и последующим образованием PA (фосфатидной кислоты) приводит к образованию F-актина из G-актина (глобулярного актина), что необходимо для создания барьера между наружной мембраной акросомы и ЦПМ и предотвращения спонтанной AP (sAR). В дальнейшем, после активации каналов CatSper  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал передается с хвостика на головку; возможно, именно в этом состоит биологический смысл взаимодействия ВД, которое мы наблюдали в своих экспериментах. Также сформулирована гипотеза о роли депо-управляемого притока  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCE) в данном процессе. SOCE активируется при опустошении ВД  $\text{Ca}^{2+}$  и осуществляется через депо-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (SOC – store operated channels: Orai1 и TRPC) при посредничестве молекулы стромального взаимодействия (STIM). PLC, активированная АФК и  $\text{Ca}^{2+}$ , гидролизует  $\text{PIP}_2$  до  $\text{IP}_3$  (активируя  $\text{IP}_3\text{R}$  и усиливая  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал) и диацилглицерола (DAG, участвующего в активации SOC и протеин киназы C – PKC). Вероятно,  $\text{IP}_3\text{R}$  также участвует в передаче  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриям (MC) через митохондриальный кальциевый унипортер (MCU), что необходимо для производства АТФ. На поздних этапах капацитации переданный на головку  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал усиливается при участии акросомального хранилища: приток  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{IP}_3\text{R}$  приводит к быстрому опустошению депо, имеющего малые объемы, что вкпе с активацией SOCE обеспечивает устойчивый приток  $\text{Ca}^{2+}$ . Последнее приводит к освобождению гельсолина, разрезанию F-актина, делая возможной индуцированную AP (iAR) при контакте с ZP3 (гликопротеином блестящей оболочки). Неупомянутые сокращения: PMCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза плазматической мембраны; NCX –  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулаума; SPCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза секреторного пути; сAMP – циклический AMP.

не акросомы, второй – стимулирует работу РКС, участвующей в обеспечении АР. Опустошение акросомального депо приводит к индукции SOCE и устойчивому притоку  $\text{Ca}^{2+}$ , что, в свою очередь, индуцирует деполимеризацию актина и запускает АР.

За последние годы исследователи значительно продвинулись в понимании молекулярно-биологических механизмов, определяющих функционирование сперматозоида и приобретение им способности к оплодотворению. Хорошо установлена и подтверждена ключевая роль  $\text{Ca}^{2+}$  в обеспечении всех постэякуляционных процессов в мужских гаметях. Однако несмотря на обширность имеющихся данных, существует множество нерешенных вопросов (в том числе: межвидовые различия биохимических механизмов, обеспечивающих фертильность; каким образом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал передается с хвостика на головку в процессе капацитации; характер взаимосвязи активации мембранных оксидаз и роста  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на начальных этапах капацитации и др.), нахождение ответов на которые позволит достичь понимания как процессов, детерминирующих оплодотворение *in vivo* и *in vitro*, так и механизмов снижения оплодотворяющей способности спермы и мужского бесплодия.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнялась в рамках программы исследований в соответствии с Госзаданием № 0445-2021-0005, запланированных во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиала ФИЦ животноводства – ВИЖ имени Л.К. Эрнста.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Correia J., Michelangeli F., Publicover S. 2015. Regulation and roles of  $\text{Ca}^{2+}$  stores in human sperm. *Reproduction*. **150** (2), R65–R76.
- Wang H., McGoldrick L.L., Chung J.J. 2020. Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nat. Rev. Urol.* **18** (1), 46–66.
- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q., Tilly J.L., Clapham D.E. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. **413** (6856), 603–609.
- Sun X.H., Zhu Y.Y., Wang L., Liu H.L., Ling Y., Li Z.L., Sun L.B. 2017. The CatSper channel and its roles in male fertility: A systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **15** (65), 1–12.
- Marquez B., Suarez S.S. 2007. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biol. Reprod.* **76** (4), 660–665.
- Marquez B., Ignatz G., Suarez S.S. 2007. Contributions of extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev. Biol.* **303**, 214–221.
- Alasmari W., Barratt C.L., Publicover S.J., Whalley K.M., Foster E., Kay V., Martins da Silva S., Oxenham S.K. 2013. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum. Reprod.* **28** (4), 866–876.
- Jin J.L., O'Doherty A.M., Wang S., Zheng H., Sanders K.M., Yan W. 2005. Catsper3 and catsper4 encode two cation channel-like proteins exclusively expressed in the testis. *Biol. Reprod.* **73** (6), 1235–1242.
- Sumigama S., Mansell S., Miller M., Lishko P.V., Cherr G.N., Meyers S.A., Tollner T. 2015. Progesterone accelerates the completion of sperm capacitation and activates CatSper Channel in spermatozoa from the rhesus macaque. *Biol. Reprod.* **93** (6), 130.
- Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal  $\text{Ca}^{2+}$  channel of human sperm. *Nature*. **471** (7338), 387–391.
- Chávez J.C., Ferreira J.J., Butler A., De La Vega Beltrán J.L., Treviño C.L., Darszon A., Salkoff L., Santi C.M. 2014. SLO3  $\text{K}^+$  channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J. Biol. Chem.* **289** (46), 32266–32275.
- Zeng X.H., Yang C., Kim S.T., Lingle C.J., Xia X.M. 2011. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated  $\text{K}^+$  current in mouse spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108** (14), 5879–5884.
- Sanchez-Carranza O., Torres-Rodriguez P., Darszon A., Trevino C.L., Lopez-Gonzalez I. 2015. Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyper-polarization of human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 554–559.
- Yeste M., Llavanera M., Pérez G., Scornik F., Puig-Parri J., Brugada R., Bonet S., Pinart E. 2019. Elucidating the role of  $\text{K}^+$  channels during *in vitro* capacitation of boar spermatozoa: Do SLO1 channels play a crucial role? *Int. J. Mol. Sci.* **20** (24), 6330.
- Lishko P.V., Botchkina I.L., Fedorenko A., Kirichok Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. **140**, 327–337.
- Mannowetz N., Miller M.R., Lishko P.V. 2017. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114** (22), 5743–5748.
- Schiffer C., Müller A., Egeberg D.L., Alvarez L., Brenker C., Rehfeld A., Frederiksen H., Wäschle B., Kaupp U.B., Balbach M., Wachten D., Skakkebaek N.E., Almstrup K., Strünker T. 2014. Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO Rep.* **15** (7), 758–765.
- Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S., Puppel S.H., Tanasa B., Hogan P.G., Lewis R.S., Daly M., Rao A. 2006. A mutation in Orail causes immune deficiency

- by abrogating CRAC channel function. *Nature*. **441** (7090), 179–185.
19. Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., Treviño C.L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91** (4), 1305–1355.
  20. Lefièvre L., Nash K., Mansell S., Costello S., Punt E., Correia J., Morris J., Kirkman-Brown J., Wilson S.M., Barratt C.L., Publicover S. 2012. 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca<sup>2+</sup> signals in human sperm. *Biochem. J.* **448** (2), 189–200.
  21. Davis F.M., Goulding E.H., D'Agostin D.M., Janardhan K.S., Cummings C.A., Bird G.S., Eddy E.M., Putney J.W. 2016. Male infertility in mice lacking the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel Orail. *Cell Calcium*. **59** (4), 189–197.
  22. Vazquez G., Wedel B.J., Aziz O., Trebak M., Putney J.W. Jr. 2004. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta*. 1742 (1–3), 21–36.
  23. Darszon A., Sánchez-Cárdenas C., Orta G., Sánchez-Tusie A.A., Beltrán C., López-González I., Granados-González G., Treviño C.L. 2012. Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res.* **349** (3), 749–764.
  24. Kumar P.G., Shoeb M. 2011. The role of trp ion channels in testicular function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704**, 881–908.
  25. Beech D.J. 2012. Integration of transient receptor potential canonical channels with lipids. *Acta Physiol. (Oxf.)*. **204** (2), 227–237.
  26. Castellano L.E., Treviño C.L., Rodríguez D., Serrano C.J., Pacheco J., Tsutsumi V., Felix R., Darszon A. 2003. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: Expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* **541** (1–3), 69–74.
  27. Sutton K.A., Jungnickel M.K., Wang Y., Cullen K., Lambert S., Florman H.M. 2004. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev. Biol.* **274** (2), 426–435.
  28. Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol.* **9**, 636–645.
  29. Lee K.P., Yuan J.P., Hong J.H., So I., Worley P.F., Muallem S. 2010. An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Lett.* **584** (10), 2022–2027.
  30. Teves M.E., Guidobaldi H.A., Uñates D.R., Sanchez R., Miska W., Publicover S.J., Morales Garcia A.A., Giojalas L.C. 2009. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*. **4** (12), e8211.
  31. Li S., Wang X., Ye H., Gao W., Pu X., Yang Z. 2010. Distribution profiles of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in rat spermatogenic cells and sperm. *Mol. Biol. Rep.* **37** (3), 1287–1293.
  32. Bernabò N., Pistilli M.G., Mattioli M., Barboni B. 2010. Role of TRPV1 channels in boar spermatozoa acquisition of fertilizing ability. *Mol. Cell Endocrinol.* **323** (2), 224–231.
  33. Kumar A., Mishra A.K., Singh V., Yadav S., Saxena A., Garg S.K., Swain D.K. 2019. Molecular and functional insights into transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in bull spermatozoa. *Theriogenology*. **128**, 207–217.
  34. De Blas G.A., Darszon A., Ocampo A.Y., Serrano C.J., Castellano L.E., Hernández-González E.O., Chirinos M., Larrea F., Beltrán C., Treviño C.L. 2009. TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One*. **4** (6), e6095.
  35. Martínez-López P., Treviño C.L., de la Vega-Beltrán J.L., De Blas G., Monroy E., Beltrán C., Orta G., Gibbs G.M., O'Bryan M.K., Darszon A. 2011. TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J. Cell Physiol.* **226** (6), 1620–1631.
  36. Cisneros-Mejorado A., Hernández-Soberanis L., Islas-Carbajal M.C., Sánchez D. 2014. Capacitation and Ca<sup>2+</sup> influx in spermatozoa: Role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology*. **2** (1), 145–154.
  37. Visconti P.E., Krapf D., De la Vega-Beltrán J.L., Acevedo J.J., Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* **13** (3), 395–405.
  38. Lievano A., Santi C.M., Serrano C.J., Treviño C.L., Bellvé A.R., Hernández-Cruz A., Darszon A. 1996. T-type Ca<sup>2+</sup> channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* **388**, 150–154.
  39. Martinez-Lopez P., Santi C.M., Trevino C.L., Ocampo-Gutierrez A.Y., Acevedo J.J., Alisio A., Salkoff L.B., Darszon A. 2009. Mouse sperm K<sup>+</sup> currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 204–209.
  40. Wennemuth G., Westenbroek R.E., Xu T., Hille B., Babcock D.F. 2000. CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca<sup>2+</sup> channels in depolarization-evoked entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **275** (28), 21210–21217.
  41. Sakata Y., Saegusa H., Zong S., Osanai M., Murakoshi T., Shimizu Y., Noda T., Aso T., Tanabe T. 2002. Ca<sub>v</sub>(<sub>v</sub>)2.3 (alpha1E) Ca<sup>2+</sup> channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett.* **516** (1–3), 229–233.
  42. José O., Hernández-Hernández O., Chirinos M., González-González M.E., Larrea F., Almanza A., Felix R., Darszon A., Treviño C.L. 2010. Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: Evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395** (4), 530–534.
  43. Stambouliau S., Kim D., Shin H.S., Ronjat M., De Waard M., Arnoult C. 2004. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *J. Cell Physiol.* **200**, 116–124.
  44. Cohen R., Buttke D.E., Asano A., Mukai C., Nelson J.L., Ren D., Miller R.J., Cohen-Kutner M., Atlas D., Travis A.J. 2014. Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. *Dev. Cell*. **28** (3), 310–321.

45. Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. 2015. Освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos taurus* в зависимости от их функционального состояния. *Цитология*. **57** (3), 233–239.
46. Li Y.Y., Jia Y.P., Duan L.Y., Li K.M. 2020. Participation of the inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channel in the zona pellucida- and progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa. *Asian J. Androl.* **22** (2), 192–199.
47. Но Н.С., Suarez S.S. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* **68**, 1590–1596.
48. Bahat A., Eisenbach M. 2010. Human sperm chemotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biol. Reprod.* **82** (3), 606–616.
49. Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. 1991. Bell-shaped calcium-response curves of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. **351** (6329), 751–754.
50. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. 2003. *Внутриклеточная сигнализация: Учеб. пособие*. Пушино: Электронное издательство “Аналитическая микроскопия”. 84 с.
51. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of  $\text{IP}_3$  receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
52. Dragileva E., Rubinstein S., Breitbart H. 1999. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* **61** (5), 1226–1234.
53. Fujinoki M. 2012. Progesterone-enhanced sperm hyperactivation through  $\text{IP}_3$ -PKC and PKA signals. *Reprod. Med. Biol.* **12** (1), 27–33.
54. La Rovere R.M., Roest G., Bultynck G., Parys J.B. 2016. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium*. **60** (2), 74–87.
55. Lefievre L., Chen Y., Conner S.J., Scott J.L., Publicover S.J., Ford W.C., Barratt C.L. 2007. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: An alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics*. **7**, 3066–3084.
56. Zhou Y., Ru Y., Wang C., Wang S., Zhou Z., Zhang Y. 2013. Tripeptidyl peptidase II regulates sperm function by modulating intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores via the ryanodine receptor. *PLoS One*. **8** (6), e66634.
57. Park K.H., Kim B.J., Kang J., Nam T.S., Lim J.M., Kim H.T., Park J.K., Kim Y.G., Chae S.W., Kim U.H. 2011.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci. Signal*. **4** (173), ra31.
58. Ruete, M.C., Lucchesi O., Bustos M.A., Tomes C.N. 2014. Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm’s acrosome during exocytosis. *Cell Commun. Signal.* **12**, 43.
59. Lucchesi O., Ruete M.C., Bustos M.A., Quevedo M.F., Tomes C.N. 2016. The Signaling module cAMP/epac/Rap1/PLC $_{\epsilon}$  / $\text{IP}_3$  mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1863** (4), 544–561.
60. Bustos M.A., Roggero C.M., De la Iglesia P.X., Mayorra L.S., Tomes C.N. 2014. GTP-bound Rab3A exhibits consecutive positive and negative roles during human sperm dense-core granule exocytosis. *J. Mol. Cell Biol.* **6** (4), 286–298.
61. Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazi F.I., Gill D.L. 1989. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools. *Nature*. **340** (6230), 236–239.
62. Хайтлина С.Ю. 2014. Внутриклеточный транспорт, основанный на полимеризации актина. *Биохимия*. **79** (9), 1135–1147.
63. Shabtay O., Breitbart H. 2016. CaMKII prevents spontaneous acrosomal exocytosis in sperm through induction of actin polymerization. *Dev. Biol.* **415** (1), 64–74.
64. Jimenez-Gonzalez C., Michelangeli F., Harper C.V., Barratt C.L., Publicover S.J. 2006. Calcium signalling in human spermatozoa: A specialized ‘toolkit’ of channels, transporters and stores. *Hum. Reprod. Update*. **12** (3), 253–267.
65. Wennemuth G., Babcock D.F., Hille B. 2003. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J. Gen. Physiol.* **122**, 115–128.
66. Andrews R.E., Galileo D.S., Martin-DeLeon P.A. 2015. Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4: Interaction with constitutive nitric oxide synthases in human sperm and prostasomes which carry  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent serine kinase. *Mol. Hum. Reprod.* **21** (11), 832–843.
67. Brandenburger T., Strehler E.E., Filoteo A.G., Caride A.J., Aumüller G., Post H., Schwarz A., Wilhelm B. 2011. Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation. *J. Biol. Chem.* **286** (10), 7938–7946.
68. Gangwar D.K., Atreja S.K. 2015. Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. *Reprod. Domest. Anim.* **50** (5), 705–711.
69. Roberts P.J., Der C.J. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. **26**, 3291–3310.
70. Aravindan R.G., Fomin V.P., Naik U.P., Modelski M.J., Naik M.U., Galileo D.S., Duncan R.L., Martin-DeLeon P.A. 2012. CASK interacts with PMCA4b and JAMA on the mouse sperm flagellum to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and motility. *J. Cell Physiol.* **227** (8), 3138–3150.
71. Enyedi A., Verma A.K., Filoteo A.G., Penniston J.T. 1996. Protein kinase C activates the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **271** (50), 32461–32467.
72. Krasznai Z., Krasznai Z.T., Morisawa M., Bazsáné Z.K., Hernádi Z., Fazekas Z., Trón L., Goda K., Márián T. 2006. Role of the  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil. Cytoskeleton*. **63** (2), 66–76.
73. Peralta-Arias R.D., Vivenes C.Y., Camejo M.I., Piñero S., Proverbio T., Martínez E., Marín R., Proverbio F. 2015. ATPases, ion exchangers and human sperm motility. *Reproduction*. **149** (5), 475–484.

74. Michelangeli F., East J.M. 2011. A diversity of SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* **39** (3), 789–797.
75. Csordas G., Hajnoczky G. 2009. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim. Biophys. Acta.* **1787**, 1352–1362.
76. Niemeyer J., Mentrup T., Heidasch R., Müller S.A., Biswas U., Meyer R., Papadopoulou A.A., Dederer V., Haug-Kröper M., Adamski V., Lüllmann-Rauch R., Bergmann M., Mayerhofer A., Saftig P., Wennemuth G., Jessberger R., Fluhrer R., Lichtenthaler S.F., Lemberg M.K., Schröder B. 2019. The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban. *EMBO Rep.* **20** (3), e46449.
77. Harper C., Wootton L., Michelangeli F., Lefièvre L., Barratt C., Publicover S. 2005. Secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SPCA1)  $\text{Ca}^{2+}$  pumps, not SERCAs, regulate complex  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  signals in human spermatozoa. *J. Cell Sci.* **118** (8), 1673–1685.
78. Gunaratne H.J., Vacquier V.D. 2006. Evidence for a secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in sea urchin spermatozoa. *FEBS Lett.* **580** (16), 3900–3904.
79. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D.E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* **427** (6972), 360–364.
80. Palty R., Silverman W.F., Hershinkel M., Caporale T., Sensi S.L., Parnis J., Nolte C., Fishman D., Shoshan-Barmatz V., Herrmann S., Khananshvil D., Sekler I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107** (1), 436–441.
81. Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. 2004. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* **567** (1), 96–102.
82. Machado-Oliveira G., Lefievre L., Ford C., Herrero M.B., Barratt C., Connolly T.J., Nash K., Morales-Garcia A., Kirkman-Brown J., Publicover S. 2008. Mobilisation of  $\text{Ca}^{2+}$  stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesized in the female reproductive tract. *Development.* **135**, 3677–3686.
83. Guerrero A., Carneiro J., Pimentel A., Wood C.D., Corkidi G., Darszon A. 2011. Strategies for locating the female gamete: The importance of measuring sperm trajectories in three spatial dimensions. *Mol. Hum. Reprod.* **17** (8), 511–523.
84. Luque G.M., Dalotto-Moreno T., Martín-Hidalgo D., Ritagliati C., Puga Molina L.C., Romarowski A., Balistrini P.A., Schiavi-Ehrenhaus L.J., Gilio N., Krapf D., Visconti P.E., Buffone M.G. 2018. Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *J. Cell Physiol.* **233** (12), 9685–9700.

## Calcium Homeostasis in Spermatozoa: Regulatory Mechanisms and Biological Significance

A. N. Nakidkina<sup>1, \*</sup>, T. I. Kuzmina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Branch of the Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Pushkin, 196625 Russia

\*e-mail: alena\_boiceva@mail.ru

Calcium is one of the most important elements for intracellular signaling. Its role is so big and complex that we can distinguish various effects and biochemical cascades involving this ion into a separate signaling system — calcium signaling. This type of cell regulation mechanisms is even more important for male gametes. The inability to perform transcription and low level of translation are the reasons why post-translational processes, many of which are activated/inhibited by calcium or its target proteins, are the main way of regulation of cell function in mature sperm. Intracellular calcium level elevation is an essential step in the processes that precede fertilization, such as capacitation, hyperactivation, and acrosome reaction (AR).  $\text{Ca}^{2+}$  is required for progressive and hyperactivated motility; sperm cell incorporate this ion to prevent spontaneous acrosome reaction and to induce AR when the time comes. Huge difference in the impact of the same ion is achieved by regulation complexity and specific localization of all the signaling elements that regulate  $\text{Ca}^{2+}$  influx and efflux, and its target proteins. Successful fertilization is impossible without proper functioning of the calcium signaling system in the male gamete. Last decade achievements in the field, mediated by recent technical advances, significantly improved our knowledge and understanding of regulation mechanisms of sperm  $\text{Ca}^{2+}$  signals in various species, as well as intracellular effects of these signals and their spatial and temporal localization. In this review we have attempted to provide the most complete picture of the mammalian sperm calcium signaling and to formulate questions that remain to be resolved.

**Keywords:** spermatozoa, calcium ions,  $\text{Ca}^{2+}$  stores, capacitation, acrosome reaction, hyperactivation

УДК 577.25;612.1.61:577.1

## ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АСТРОЦИТЫ КРЫСЫ, ПОДВЕРГНУТЫЕ КИСЛОРОДНО-ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ

© 2022 г. Е. А. Абрамов<sup>a</sup>, А. Е. Иванова<sup>b</sup>, Э. Б. Дашинимаев<sup>b, c, d</sup>,  
А. Г. Камкин<sup>b</sup>, Л. Р. Горбачева<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>b</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

<sup>c</sup>Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН,  
Москва, 119334 Россия

<sup>d</sup>Московский физико-технический институт (Государственный университет),  
Долгопрудный, 141701 Россия

\*e-mail: gorbi67@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2021 г.

После доработки 15.05.2021 г.

Принята к публикации 31.05.2021 г.

Ишемия мозга представляет собой сложный комплекс повреждающих факторов, к которым относятся депривация кислорода и глюкозы, а также возможность повторных поражений в период реперфузии ткани. Тромбин, ключевая сериновая протеаза гемостаза, может быть обнаружена в паренхиме мозга при ишемических и геморрагических инсультах, куда попадает непосредственно из кровеносного русла через поврежденный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В настоящей работе оценено влияние тромбина на состояние глиальных клеток мозга в условиях кислородно-глюкозной депривации и последующей нормоксии (модель ишемии/реперфузии). Обнаружено, что тромбин в низких концентрациях (10 нМ) обладает защитным действием на астроциты крысы при ишемии/реперфузии. Предварительная инкубация астроцитов с протеазой в низкой концентрации вызывала повышение выживаемости клеток в данных условиях, в то время как повышение концентрации (50 нМ) снижало ее защитное действие. Выявлено, что тромбин в обеих концентрациях не влияет на индуцированную ишемией/реперфузией пролиферацию астроцитов. Было показано, что кислородно-глюкозная депривация приводит к перераспределению актиновых филаментов в астроцитах из-под мембранного пространства в область ядра клетки. Тромбин в высокой концентрации потенцировал влияние кислородно-глюкозной депривации на актиновый цитоскелет астроцитов. Таким образом, тромбин является эндогенной регуляторной молекулой для астроцитов мозга, и его действие на фоне кислородно-глюкозной депривации и последующей реперфузии носит дозозависимый характер.

**Ключевые слова:** тромбин, кислородно-глюкозная депривация, ишемия-реперфузия, рецепторы, активированные протеазами (PARs), астроциты, пролиферация, актин

DOI: 10.31857/S0233475522010042

### ВВЕДЕНИЕ

Инсульт, занимая лидирующую позицию среди причин смертности и инвалидизации населения, является одной из главных современных медико-социальных проблем [1]. В связи с этим разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта является одной из главных задач как фундаментальной физиологии, так и современной медицины. Ишемический инсульт наиболее часто встречающийся тип данного заболевания, связанный с сокращением или полным прекращением кровоснабжения ткани след-

ствие тромбирования, резкого сужения или эмболии сосудов. Эти события непосредственно связаны с системой гемостаза и в первую очередь с ее ключевой протеазой — тромбином. Тромбин регулирует клеточные функции через активацию специфических рецепторов, активируемых протеазами — PAR, посредством расщепления внеклеточного N-конца с образованием укороченной аминокислотной последовательности (“привязанного лиганда”) [2]. Показано, что при ишемии мозга экспрессия данного вида рецепторов увеличивается [3], при этом появление тромбина в

очаге повреждения преимущественно происходит за счет проникновения через поврежденный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [4, 5]. Протромбин, прекурсор тромбина, экспрессируется клетками мозга [6]. Имеющиеся в литературе данные и наши собственные исследования указывают на способность тромбина оказывать противоположное действие на клетки в зависимости от его концентрации и типа воздействия [7]. Тромбин в высоких концентрациях обладает провоспалительными свойствами, стимулирует выброс цитокинов, вызывает гибель нейронов и активирует астро- и микроглию [8–10]. В связи с этим целью данного исследования было изучение влияния тромбина на первичную культуру астроцитов крыс при кислородно-глюкозной депривации (КГД) *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы, использованные в работе:** тромбин (Sigma, США), HBSS с  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco, США), HBSS без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco), 100 мМ пируват натрия, 1М HEPES, L-Cystein-HCl, BSA, глюкоза, папаин (Sigma), ДНКаза (Sigma); среды для культивирования клеток DMEM/F12, DMEM и DMEM без глюкозы (ПанЭко, Россия); инaktivированная телячья сыворотка HI FBS (Invitrogen, США), GlutaMax (Invitrogen), пенициллин/стрептомицин (Invitrogen), трипсин-EDTA 0.5% (Invitrogen); набор реактивов для измерения содержания LDH (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, США), фаллоидин (Cell Signaling, США), ДНК-тропный краситель DAPI, PSA (персульфат аммония, Sigma), 12% раствор хлоралгидрата (Sigma).

**Получение культуры астроцитов.** Работа выполнена на первичной культуре астроцитов, полученных из коры головного мозга новорожденных крысят по ранее описанному протоколу [11]. Полученную суспензию астроцитов на 10-ый день культивации *in vitro* высевали на чашки с прикрепленными стеклами (glassbottom) и на 48-луночные планшеты в количестве  $7 \times 10^4$  клеток на ячейку. Далее астроциты инкубировали 4 дня при 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Однородность культуры астроцитов составляла более 90% при окрашивании антителами к специфическому глиальному фибриллярному кислому белку GFAP. На момент проведения эксперимента первичной культуре астроцитов крыс было 14 дней.

**Моделирование ишемии *in vitro*.** Кислородно-глюкозная депривация (КГД) — это модель *in vitro*, имитирующая эффекты инсульта [12]. КГД моделировали инкубированием клеток в среде DMEM без глюкозы в течение 5 ч при 5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 90%  $\text{N}_2$ , при 37°C. После 5-часовой КГД производили реперфузию, заменяя в культуре астроцитов

DMEM без глюкозы на DMEM с 4.5 г/л глюкозы, культивируя их при 21%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 74%  $\text{N}_2$  и 37°C последующие 24 ч до регистрации исследуемых параметров. В качестве контрольной группы были выбраны интактные клетки без тромбина в аналогичных условиях.

**Оценка уровня гибели астроцитов.** При нарушении целостности цитоплазматической мембраны клеток высвобождается лактатдегидрогеназа (LDH) [13]. Под действием LDH соли тетразолия (иодонитротетразолий, INT) превращаются в красный формазан. Интенсивность окрашивания культуральной среды пропорциональна количеству LDH — доле клеток с нарушенной мембраной, что позволяет оценить уровень некроза. Количество LDH оценивали с использованием CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Для анализа отбирали 30 мкл клеточной среды и смешивали с 30 мкл CytoTox 96 Reagent. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. После чего реакцию останавливали добавлением 30 мкл Stop Solution. Оптическую плотность измеряли при 490 нм на фотометре iMark (Bio-Rad, США).

**Оценка пролиферации астроцитов (МТТ-тест).** МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) восстанавливается до формазана дегидрогеназами митохондрий живых клеток [14]. Водный раствор МТТ добавляли в культуральную среду с астроцитами до конечной концентрации 500 мкг/мл и инкубировали 1 час при 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . Далее культуральную среду отбирали и к клеткам добавляли 150–300 мкл диметилсульфоксида (DMSO, Sigma) для растворения формазанов. Оптическую плотность измеряли с помощью фотометра iMark (Bio-Rad) при 530 нм.

При обработке данных оптическую плотность контрольной группы (интактные астроциты) принимали за 100%.

**Иммуноцитохимическое окрашивание актина.** Для оценки реорганизации актина астроциты, культивируемые на стеклах, промывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали в 4% параформальдегиде (15 мин). После отмывки 120 мМ Na-фосфатом,  $1 \times 10$  мин низкосолевым буфером (150 мМ NaCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),  $2 \times 10$  мин высокосолевым буфером (0.5 М NaCl, 20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) блокировали неспецифическое связывание инкубацией клеток в блокирующем буфере, содержащем 0.1% Triton X-100, 5% FBS в фосфатно-солевом буфере. Далее астроциты инкубировали с фаллоидином (фаллоидин Alexa 488, Cell Signaling, 1:40), токсином, связывающим F-актин, в течение 1.5 ч. После чего клетки промывали  $1 \times 10$  мин высокосолевым буфером (0.5 М NaCl, 20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),  $1 \times 10$  мин 120 мМ Na-фосфатом,  $1 \times 10$  мин 5 мМ Na-фосфатом. Для детекции ядер использовали ДНК-тропный краситель

DAPI (1 : 500). Регистрацию флуоресценции фаллоидина осуществляли при помощи конфокального микроскопа (ZEISS LSM 700, Германия), получая не менее 5 снимков с каждого образца.

**Статистический анализ.** Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Для анализа использовали параметрический критерий One-way ANOVA и непараметрические критерии Манна–Уитни (Mann–Whitney test) и Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test). Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (mean  $\pm$  SEM). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние тромбина на выживаемость культивируемых астроцитов при пятичасовой кислородно-глюкозной депривации (КГД).** Известно, что депривация глюкозы и кислорода вызывает гибель клеток при ишемии головного мозга. В первой серии экспериментов мы исследовали влияние тромбина в низкой (10 нМ) и высокой (50 нМ) концентрациях на жизнедеятельность культивируемых астроцитов мозга крыс при КГД. При нарушении целостности мембраны клеток происходит высвобождение в среду культивирования устойчивого фермента, LDH, по количеству которого можно оценить уровень некроза клеток. Изолированная депривация глюкозы в течение 5 ч не вызывала гибель клеток; в то время как 5-часовая гипоксия (5% O<sub>2</sub>) приводила к повышению данного показателя на 23% по сравнению с нормоксией (4.5 г/л глюкозы, 21% O<sub>2</sub>) (рис. 1). 30-минутное воздействие тромбина в концентрации 10 нМ (рис. 1а) перед КГД снижало гибель клеток до контрольных значений, тогда как тромбин в концентрации 50 нМ не обладал защитным действием (рис. 1б).

**Влияние тромбина на выживаемость культивируемых астроцитов крыс после реперфузии.** Основные современные терапевтические подходы при инсульте головного мозга направлены на возобновление кровотока в области, подвергшейся ишемии. В связи с этим в данной серии экспериментов мы исследовали влияние тромбина в концентрациях 10 и 50 нМ на выживаемость астроцитов мозга крыс после 24-часовой реперфузии (после КГД клетки помещали в среду DMEM с 4.5 г/л глюкозой, 21% O<sub>2</sub>). В ходе реперфузии тромбин добавляли к клеткам повторно в тех же концентрациях, что и при КГД. Уровень некроза клеток оценивали по высвобождению LDH. Показано, что после реперфузии в группах, подвергнутых гипоксии (5% O<sub>2</sub>), гибель клеток на 15% выше, чем при нормоксии (рис. 2а). Во всех используемых концентрациях тромбин снижал уро-

вень некроза астроцитов до значений близких к контрольным при нормоксии.

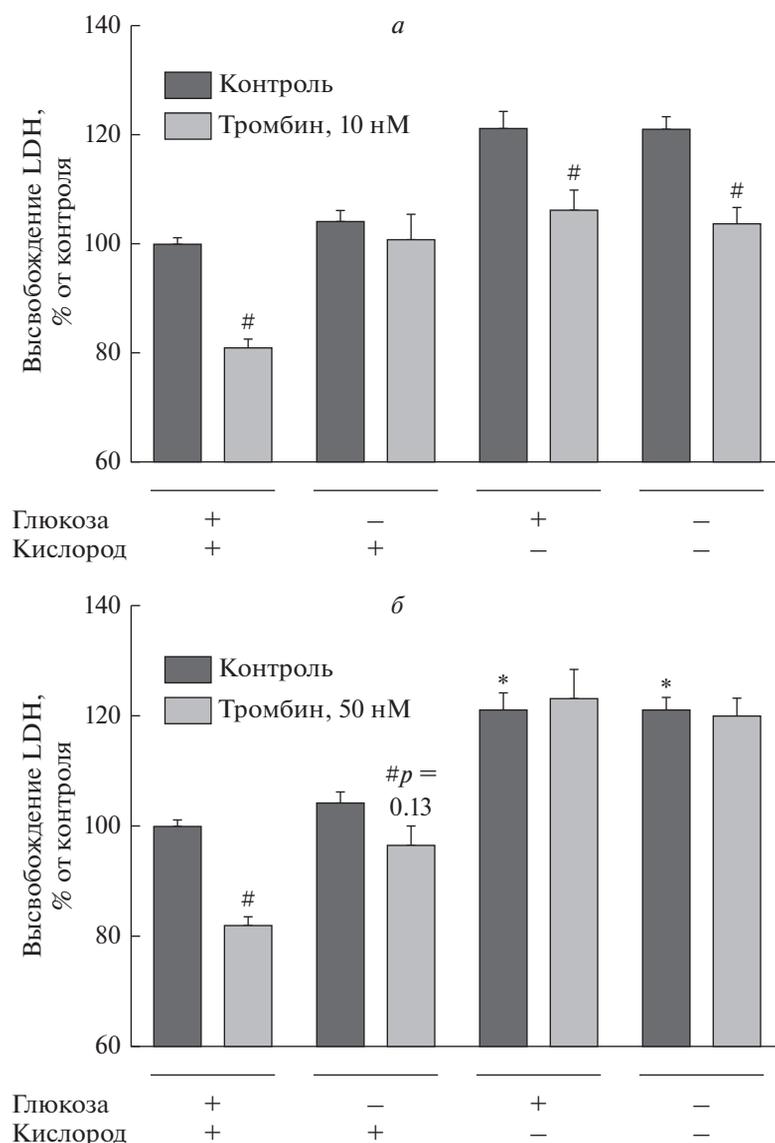
**Влияние тромбина на пролиферацию астроцитов после ишемии/реперфузии.** Ранее было показано, что ишемия стимулирует развитие реактивного астроглиоза [14, 15]. На следующем этапе нашей работы мы исследовали влияние тромбина в концентрациях 10 и 50 нМ на пролиферацию астроцитов после 24-часовой реперфузии. Мы обнаружили, что гипоксия стимулировала повышение пролиферации астроцитов на 21% по сравнению с нормоксией, в то время как депривация глюкозы подобного эффекта не вызывала (рис. 3). Тромбин в используемых концентрациях не оказывал влияния на пролиферацию клеток в условиях КГД. Однако в условиях нормоксии тромбин 10 и 50 нМ способствовал повышению уровня пролиферации астроцитов по сравнению с контролем.

**Актиновый цитоскелет культивируемых астроцитов при КГД и на фоне действия тромбина.** Известно, что одним из маркеров астроглиоза является изменение морфологии клеток, что определяется состоянием цитоскелета, поэтому нами было оценено состояние F-актина в условиях КГД с использованием фаллоидина. Установлено, что при нормоксии F-актин располагается преимущественно в примембранном пространстве, стабилизируя форму клетки. Пятичасовая КГД вызывала перераспределение актина из примембранной области в область ядра и ретракцию цитоплазмы. Тромбин 50 нМ потенцировал формирование стресс-фибрилл и усиливал ретракцию цитоплазмы при КГД.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мозговые инсульты как геморрагического, так и ишемического типов тесно связаны с системой гемостаза [16–20]. Ишемия мозга, спровоцированная образованием тромба, сопровождается изменением локальной концентрации сериновых протеаз гемостаза, в первую очередь тромбина [21, 22]. Известно, что протеазы гемостаза участвуют не только в процессе коагуляции, но и в регуляции пролиферации, миграции, воспаления, апоптоза и других клеточных функций через специфические рецепторы, активируемые протеазами (PAR) [2, 11, 19, 23, 24].

Основная доля (80%) всех инсультов имеет ишемический характер и только около 15% вызваны геморрагическим повреждением кровотока. Несмотря на запуск реперфузии областей мозга, подвергнутых ишемии, даже краткосрочное (до 60 мин) снижение кровотока в ишемической области до 20 мл/г и ниже запускает процессы, ведущие к гибели клеток мозга [25]. Астроциты, наряду с нейронами, остро реагируют на ишемическое воздействие [14, 15]. Результаты наших ис-

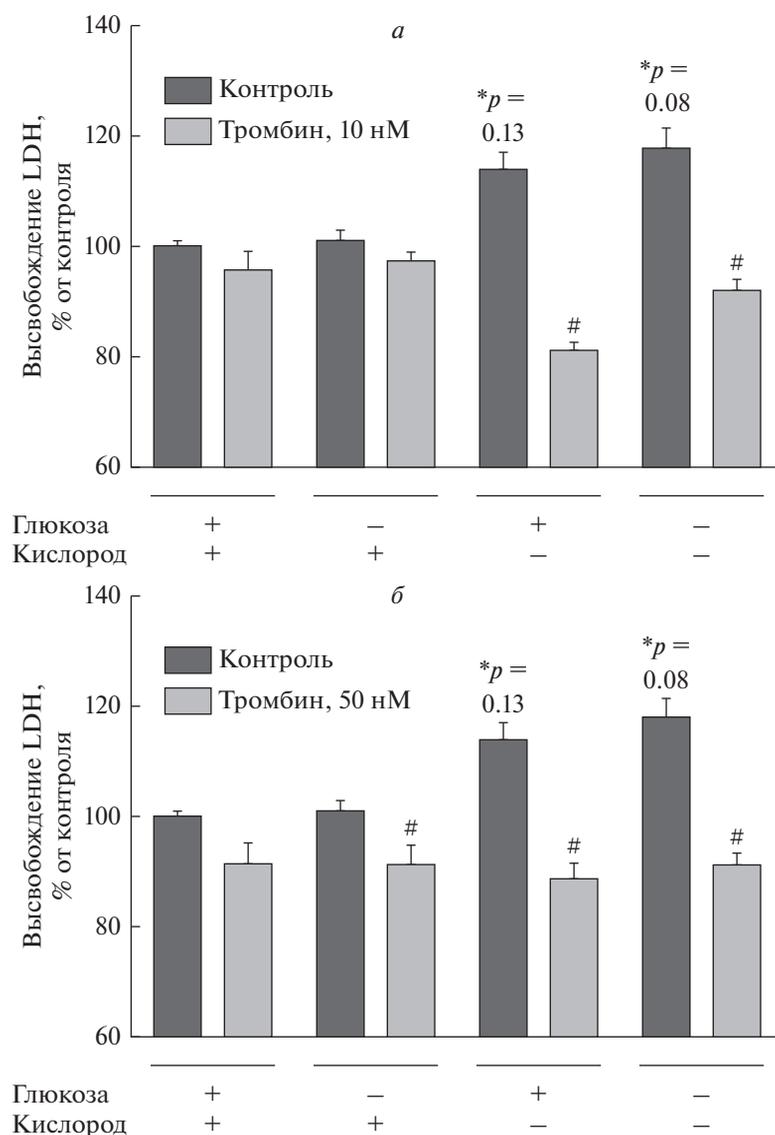


**Рис. 1.** Влияние тромбина (10 нМ (а) и 50 нМ (б)) на гибель астроцитов после 5-часовой КГД. Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  относительно контрольной группы в условиях нормоксии (4.5 г/л глюкозы и 21% O<sub>2</sub> в среде), Kruskal–Wallis test; # $p < 0.05$  относительно группы без тромбина в тех же условиях.

следований подтверждают эти данные. Более того, согласно представленным результатам, ключевым повреждающим фактором при 5-часовой КГД для культивируемых астроцитов является именно гипоксия, а не депривация глюкозы (рис. 1). Согласно литературным данным устойчивость глиальных клеток к снижению уровня глюкозы в среде может определяться тем, что астроциты, являясь депо гликогена в мозге, обеспечивают глюкозой и молочной кислотой при гипоксии не только собственное функционирование, но и жизнедеятельность нейронов [14, 15].

Ранее было показано, что тромбин — ключевая сериновая протеаза гемостаза, через специфический тип рецепторов (PAR) модулирует выживаемость

клеток мозга при разных патологических состояниях, в том числе и при ишемии [7, 22, 26, 27]. Повышение содержания тромбина в тканях мозга, по-видимому, возможно не только в результате нарушения ГЭБ [17, 28], но и из протромбина, экспрессия которого показана в мозге [21]. Протеаза может оказывать на клетки мозга как нейродегенеративное, так и нейропротекторное действие, что определяется ее концентрацией [7, 29]. Рецепторы тромбина уже давно обнаружены на астроцитах, что обеспечивает возможность их активации тромбином и запуска внутриклеточных сигнальных каскадов [30, 31]. В настоящем исследовании установлено, что влияние тромбина на гибель клеток в культуре астроцитов

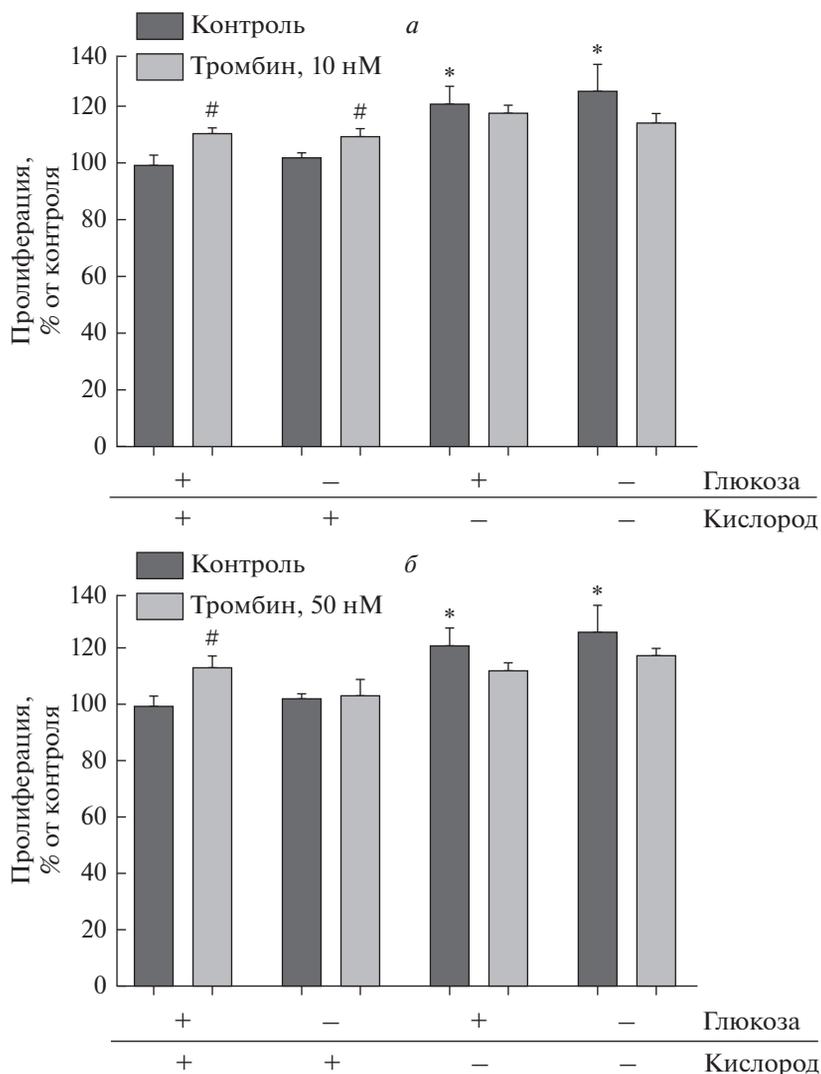


**Рис. 2.** Влияние тромбина в концентрациях 10 нМ (а) и 50 нМ (б) на гибель астроцитов мозга крыс после 24-часовой реперфузии. После 5-часовой депривации (глюкозы, кислорода или кислородно-глюкозной) или нормоксии клетки помещали в среду DMEM с 4.5 г/л глюкозой, при 21% O<sub>2</sub>, через 24 ч оценивали гибель астроцитов по высвобождению LDH. Контроль – группа без тромбина при соответствующих условиях (нормоксии, депривации глюкозы, депривации кислорода (5% O<sub>2</sub>) и КГД). Mean ± SEM. \**p* < 0.05 относительно контрольной группы в условиях нормоксии (4.5 г/л глюкозы и 21% O<sub>2</sub> в среде), Kruskal-Wallis test; #*p* < 0.05 относительно группы без тромбина в тех же условиях.

при КГД определяется концентрацией протеазы, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными на нейрональной культуре в условиях глутаматной эксайтотоксичности [32]. На основе полученных и уже имеющихся данных можно заключить, что концентрация тромбина 10 нМ обладает защитным действием, как на культивируемых нейронах, так и на астроцитах; в то время как 50 нМ тромбина обладает токсическим действием на нейроны и не изменяет выживаемость астроцитов при КГД (рис. 1) [32].

Известно, что одним из наиболее важных событий после ишемии головного мозга является

восстановление притока крови – реперфузия. Показано, что именно в этот период появляется большое количество активных форм кислорода, приводящих к новой волне некроза в ишемической области [25]. В настоящей работе, мы предположили, что тромбин в низкой концентрации должен снижать некроз, вызванный реперфузией, подобно своему действию во время гипоксии. Полученные данные подтвердили наше предположение (рис. 2а). Кроме того, мы обнаружили, что тромбин в высокой концентрации также обладал защитным действием на астроциты мозга крыс после ишемии/реперфузии (рис. 2б). Таким

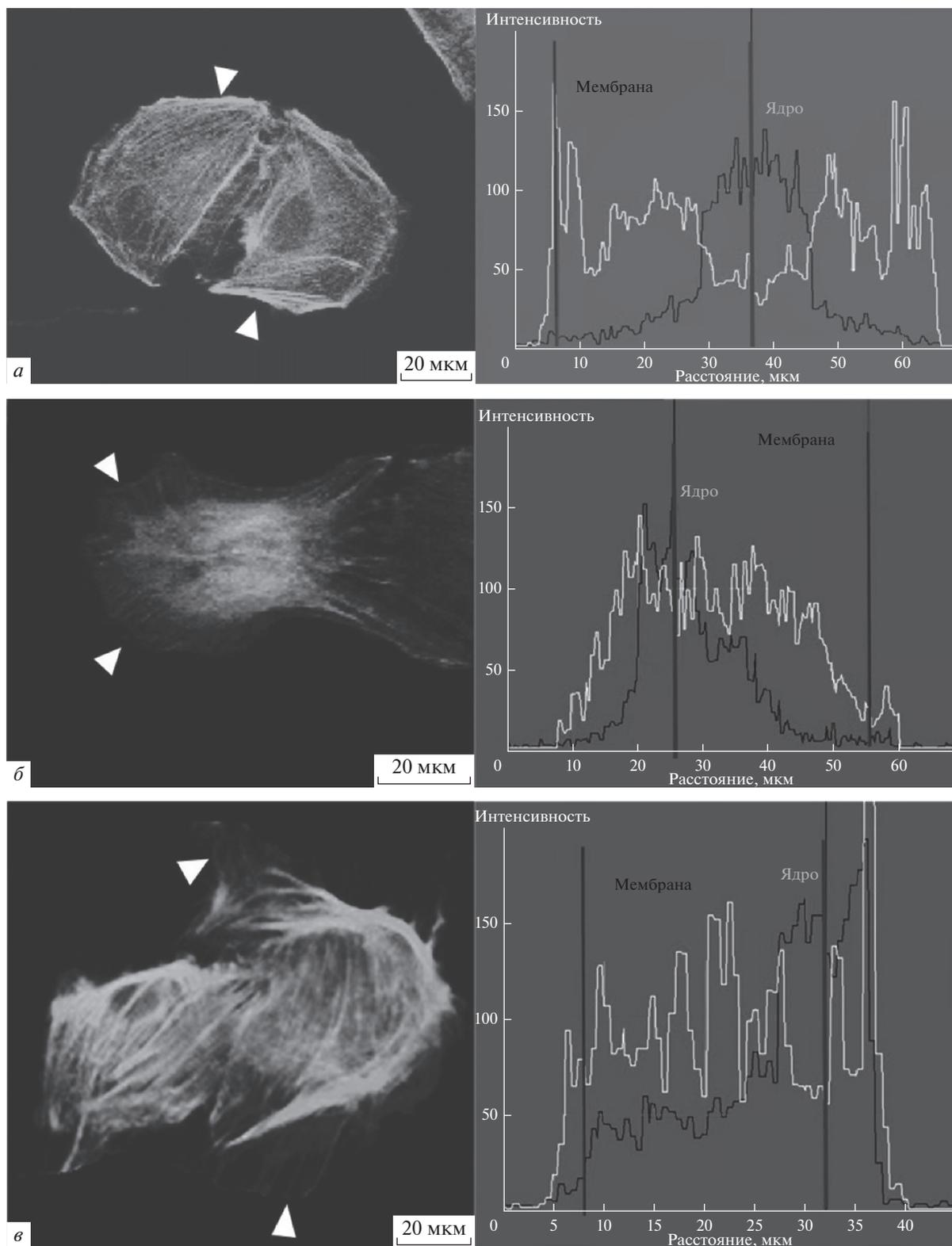


**Рис. 3.** Влияние тромбина в концентрациях 10 нМ (а) и 50 нМ (б) на пролиферацию астроцитов в постшемический реперфузионный период через 24 ч. Контроль — контрольная группа при нормоксии. Mean  $\pm$  SEM, Mann–Whitney test. \* $p < 0.05$  относительно контрольной группы в условиях нормоксии (4.5 г/л глюкозы и 21% O<sub>2</sub> в среде), # $p < 0.05$  относительно группы без тромбина в в тех же условиях.

образом, тромбин в диапазоне концентраций 10–50 нМ обладает защитным действием на астроглию во время ишемии/реперфузии, но данный эффект наиболее выражен при низких концентрациях протеазы, что согласуется с литературными данными о защитном действии тромбина на клетки мозга [7, 22, 26, 27].

В последнее время особое внимание исследователей направлено на процесс, именуемый как реактивный астроглиоз — явление патологической активации астроглии, для которого характерно развитие функциональных и морфологических изменений в клетках, усиление пролиферации [14, 15, 33]. Многие патологические состояния, такие как нейровоспаление, нейродегенеративные заболевания и ишемия головного мозга, со-

провожаются активацией астроглии и развитием реактивного астроглиоза [34]. Подобный феномен при нарушениях мозговой деятельности, усугубляя течение ишемии, а также способствуя прогрессированию хронических нейродегенеративных заболеваний, остается серьезной проблемой медицинской практики, поскольку на данный момент нет эффективных способов его модуляции. Тромбин — один из факторов, стимулирующих активную пролиферацию астроцитов и способствующий формированию глиального рубца при повреждении мозга [35]. Нами обнаружено, что тромбин в диапазоне концентраций 10–50 нМ не изменяет пролиферацию при гипоксии (рис. 3) в отличие от своего пролиферативного действия в условиях нормоксии.



**Рис. 4.** Распределение интенсивности окрашивания F-актина в астроцитах в условиях нормоксии (*a*), КГД (*б*), КГД с тромбином (50 нМ) (*в*). Ядерный маркер – DAPI, маркер актина – Phalloidin Alexa 488. Интенсивность флуоресценции в подмембранной области – линия “мембрана”, в области ядра – “ядро”. Белый треугольник – граница клетки (клеточная мембрана).

Считается, что зрелые астроциты в норме не пролиферируют [36]. В связи с этим для экспериментов *in vitro* астроциты выделяют из новорожденных животных. Кортикальные астроциты грызунов созревают в течение первых недель постнатального развития, пролиферируя и увеличивая размер популяции в 6–8 раз [37]. Общепринятой практикой является использование в экспериментах астроцитов на 7–25 день культивирования [38–40].

При патологических состояниях головного мозга астроглия активируется [5]. Показано, что астроглиоз характеризуется не только повышением пролиферации клеток, но также изменением морфологии астроцитов, что определяется состоянием цитоскелета [14, 15]. Ранее были опубликованы работы о том, что в нормальных условиях F-актин располагается преимущественно в примембранном пространстве, стабилизируя форму клетки [41, 42]. Наши исследования подтверждают эти данные (рис. 4а). Пятичасовая ишемия стимулировала перераспределение актина из примембранной области в область ядра и ретракцию цитоплазмы (рис. 4б). Высокие концентрации тромбина потенцировали формирование стресс-фибрилл и усиливали ретракцию цитоплазмы при КГД (рис. 4в). Такое изменение, вызванное тромбином, может выступать одним из возможных механизмов его влияния на выживаемость/гибель клеток. Так ранее было показано, что стабилизация F-актина в астроцитах приводит к уменьшению размера и количества лизосом, подавляет их созревание и разрыв при аутофагии, предотвращая тем самым гибель клеток [43].

Таким образом, представленные результаты демонстрируют, что сериновая протеаза тромбин является эндогенной регуляторной молекулой для клеток мозга. Действие протеазы носит дозозависимый характер и определяется типом повреждения. Установлено, что для культивируемых астроцитов крыс защитным действием при ишемии обладает тромбин в концентрации 10 нМ, предотвращающий гибель клеток, вызванную КГД. Протеаза в более высокой концентрации вызывают активацию астроглии, что влечет за собой потенцирование гибели клеток мозга при КГД. Итак, представленные результаты позволяют понять особенности развития повреждений мозговой ткани в условиях ишемии и реперфузии и установить динамику изменения регулирующих роли тромбина при данной патологии. Эти данные представляют интерес не только для фундаментальной физиологии и медицины, но и указывают на необходимость учета действия тромбина вне системы гемостаза при определении тромболитической и антикоагулянтной терапии для пациентов с ишемическим инсультом и другими нарушениями мозгового кровотока.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания ИБР РАН 2020 года, № 0108-2019-0004 и с использованием оборудования Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walter J., Oyere O., Mayowa O., Sonal S. 2016. Stroke: A global response is needed. *Bull. World Health Organ.* **94**, 634–634.
2. Strukova S.M. 2001. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 8–18.
3. Wang J., Jin H., Hua Y., Keep R., Xi G. 2012. Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia. *Stroke*, **43**, 2476–2482.
4. Sokolova E., Reiser G. 2008. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: Localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thromb. Haemost.* **100**, 576–581.
5. Nicole O., Goldshmidt A., Hamill C.E., Sorensen S.D., Sastre A., Lyuboslavsky P., Hepler J.R., McKeon R.J., Traynelis S.F. 2005. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astroglialosis after brain injury. *J. Neurosci.* **25**, 4319–4329.
6. Rajput S.P., Lamb J., Kothari S., Pereira B., Soetkamp D., Wang Y., Tang J., Van Eyk E.J., Mullins S.E., Lyden D.P. 2019. Neuron-generated thrombin induces a protective astrocyte response via protease activated receptors. *Glia*. **68** (2), 246–262.
7. Hu H., Yamashita S., Hua Y., Keep R.F., Liu W., Xi G. 2010. Thrombin-induced neuronal protection: role of the mitogen activated protein kinase/ribosomal protein S6 kinase pathway. *Brain Res.* **1361**, 93–101.
8. Simmons S., Lee R. V., Moller T., Weinstein J.R. 2013. Thrombin induces release of proinflammatory chemokines interleukin-8 and interferon-g-induced protein-10 from cultured human fetal astrocytes. *Neuroreport*. **24** (1), 36–40.
9. Suo Z., Citron B.A., Festoff B.W. 2004. Trombin: A potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. **3** (1), 105–114.
10. Xi G., Reiser G., Keep R.F. 2002. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective. *J. Neurochem.* **84**(1), 3–9.

11. Ivanova A.E., Gorbacheva L.R., Strukova S.M., Pinelis V.G., Reiser G. 2014. Activated protein C and thrombin participate in the regulation of astrocyte functions. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A. Membr. Cell Biol.* **8**, 50–59.
12. Holloway P.M., Gavins F.N.E. 2016. Modeling ischemic stroke in vitro: Status quo and future perspectives. *Stroke.* **47** (2), 561–569.
13. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55–63.
14. Sofroniew M.V., Vinters H.V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7–35.
15. Горбачева Л.Р., Помыткин И.А., Сурин А.М., Абрамов Е.А., Пинелис В.Г. 2018. Астроциты и их роль в патологии центральной нервной системы. *Росс. недиатр. журн.* **21**, 1, 46–53.
16. Rajput P.S., Lyden P.D., Chen B., Lamb J.A., Pereira B., Lamb A., Zhao L., Lei I.F., Bai J. 2014. Protease activated receptor-1 mediates cytotoxicity during ischemia using in vivo and in vitro models. *Neurosci.* **281**, 229–240.
17. De Castro Ribeiro M., Badaut J., Price M., Meins M., Bogousslavsky J., Monard D., Hirt L. 2006. Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp. Neurol.* **198**, 199–203.
18. Xi G., Keep R.F., Hua Y., Xiang J., Hoff J.T. 1999. Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning. *Stroke.* **30**, 1247–1255.
19. Mosnier L.O., Zlokovic B.V., Griffin J.H. 2014. Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* **112**, 883–892.
20. Cheng T., Liu D., Griffin J.H., Fernández J.A., Castellino F., Rosen E.D., Fukudome K., Zlokovic B.V. 2003. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.* **9**, 338–342.
21. Krenzlin H., Lorenz V., Danckwardt S., Kempfski O., Alessandri B. 2016. The importance of thrombin in cerebral injury and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 77–85.
22. Striggow F., Riek M., Breder J., Henrich-Noack P., Reymann K.G., Reiser G. 2000. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 2264–2269.
23. Strukova S. 2006. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front. Biosci.* **11**, 59–80.
24. Gorbacheva L.R., Kiseleva E.V., Savinkova I.G., Strukova S.M. 2017. A new concept of action of hemostatic proteases on inflammation, neurotoxicity, and tissue regeneration. *Biochemistry (Moscow).* **82**, 778–790.
25. Meschia J.F., Brott T. 2018. Ischaemic stroke. *Eur. J. Neurol.* **25**, 35–40.
26. Jiang Y., Wu J., Hua Y., Keep R.F., Xiang J., Hoff J.T., Xi G. 2002. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 404–410.
27. Masada T., Xi G., Hua Y., Keep R.F. 2000. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **867**, 173–179.
28. Machida T., Takata F., Matsumoto J., Miyamura T., Hirata R., Kimura I., Kataoka Y., Dohgu Sh., Yamachi A. 2017. Contribution of thrombin-reactive brain pericytes to blood-brain barrier dysfunction in an in vivo mouse model of obesity-associated diabetes and an in vitro rat model. *PLoS ONE.* **12**(5), e0177447.
29. Suo Z., Citron B.A., Festoff B.W. 2004. Thrombin: A potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* **3**, 105–114.
30. Weinstein J.R., Gold S.J., Cunningham D.D., Gall C.M. 1995. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: Expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.* **15**, 2906–2919.
31. Junge C.E., Lee C.J., Hubbard K.B., Zhang Z., Olson J.J., Hepler J.R., Brat D.J., Traynelis S.F. 2004. Protease-activated receptor-1 in human brain: Localization and functional expression in astrocytes. *Exp. Neurol.* **188**, 94–103.
32. Gorbacheva L., Pinelis V., Ishiwata S., Strukova S., Reiser G. 2010. Activated protein C prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor-kappaB in cultured hippocampal neurons. *Neurosci.* **165**, 1138–1146.
33. Sofroniew M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**, 638–647.
34. Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* **565**, 30–38.
35. Wang H., Ubl J.J., Stricker R., Reiser G. 2002. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, 1351–1364.
36. Guizzetti M., Kavanagh T.J., Costa L.J. 2011. Measurements of astrocyte proliferation. *Meth. Mol. Biol.* **758**, 349–359.
37. Ge W.P., Miyawaki A., Gage F.H., Jan Y.N., Jan L.Y. 2012. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature.* **484**, 376–380.
38. Moreno C., Sampieri A., Vivas O., Pena-Segura C., Vaca L. 2012. STIM1 and Orail mediate thrombin-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat cortical astrocytes. *Cell Calcium.* **52**, 457–67.
39. Wang H., Ubl J.J., Stricker R., Reiser G. 2002. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C1351–C1364.
40. Simmons M.L., Murphy S. 1992. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J. Neurochem.* **59**, 897–905.
41. Delbro D., Westerlund A., Björklund U., Hansson E. 2009. In inflammatory reactive astrocytes co-cultured with brain endothelial cells nicotine-evoked Ca<sup>2+</sup> transients are attenuated due to interleukin-1β release and

- rearrangement of actin filaments. *Neurosci.* **159**, 770–779.
42. O'Shea R.D., Lau C.L., Farso M.C., Diwakarla S., Zagami C.J., Svendsen B.B., Feeney S.J., Callaway J.K., Jones N.M., Pow D.V., Danbolt N.C., Jarrott B., Beart P.M. 2005. Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1. *Neurochem. Int.* **48**, 604–610.
43. Ryu H.J., Kim J.E., Yeo S.I., Kim D.W., Kwon O.S., Choi S.Y., Kang T.C. 2011. F-actin depolymerization accelerates clasmotodendrosis via activation of lysosome-derived autophagic astroglial death. *Brain Res. Bull.* **85**, 368–373.

## Effect of Thrombin on Cultured Rat Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation

E. A. Abramov<sup>1</sup>, A. E. Ivanova<sup>2</sup>, E. B. Dashinimaev<sup>2, 3, 4</sup>, A. G. Kamkin<sup>2</sup>, L. R. Gorbacheva<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Biological department, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

<sup>3</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, 141701 Russia

\*e-mail: gorbi67@mail.ru

Cerebral ischemia is a complex of damaging factors, which include oxygen and glucose deprivation, as well as the possibility of repeated lesions during the period of tissue reperfusion. Thrombin, a key serine protease of hemostasis, can be found in the brain parenchyma in ischemic and hemorrhagic strokes, where it enters directly from the bloodstream through the damaged blood-brain barrier (BBB). In this work, the effects of the main hemostasis protease, thrombin, on the state of brain glial cells under conditions of oxygen-glucose deprivation and subsequent normoxia ("ischemia/reperfusion" model) were estimated. It was found that thrombin in low concentrations (10 nM) has a protective effect on rat astrocytes during ischemia/reperfusion. Pre-incubation of astrocytes with a low concentration of protease caused an increase in cell survival under these conditions, while an increase in the concentration (50 nM) reduced its protective effect. It was revealed that thrombin in both concentrations does not affect the proliferation of astrocytes induced by ischemia/reperfusion. It was shown that oxygen-glucose deprivation leads to the redistribution of actin filaments in astrocytes from under the membrane space to the region of the cell nucleus. Thrombin in high concentration potentiated the effect of oxygen-glucose deprivation on the actin cytoskeleton of astrocytes. Thus, the nature of the effect of thrombin on cerebral astrocytes during oxygen-glucose deprivation and subsequent reperfusion is dose-dependent.

**Keywords:** thrombin, oxygen-glucose deprivation, protease-activated receptors (PARs), astrocytes, proliferation, actin

УДК 577.3

## РЕГУЛЯЦИЯ СТРУКТУРНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА: МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2022 г. В. В. Войнаровский<sup>а</sup>, \*, Г. Г. Мартинович<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Республика Беларусь

\*e-mail: [voynarovskiy@bsu.by](mailto:voynarovskiy@bsu.by)

Поступила в редакцию 28.03.2021 г.

После доработки 26.07.2021 г.

Принята к публикации 27.07.2021 г.

В работе проведен анализ регуляторных механизмов, индуцируемых внеклеточным пероксидом водорода, на основе математической модели, учитывающей ключевые этапы образования метгемоглобина и феррилгемоглобина и их связывания с мембраной эритроцитов. В результате численного моделирования показано, что обратимое связывание метгемоглобина с мембраной является адаптивным механизмом, направленным на стабилизацию липидного бислоя мембраны. С другой стороны, рост концентрации феррилгемоглобина и его связывание с мембраной приводит к усилению патофизиологических процессов, снижающих структурную стабильность клеток. Количество образованных метгемоглобинов и феррилгемоглобинов зависит от концентрации внеклеточного пероксида водорода и времени инкубирования, числа клеток в растворе, состояния антиоксидантной системы эритроцитов, метаболической активности клеток и внешних метаболических условий. На основе численного моделирования установлены оптимальные условия (концентрация окислителя, время инкубирования), при которых наблюдается активация адаптационных процессов. При гемолизе эритроцитов в экспериментах *in vitro* показано, что при действии пероксида водорода в концентрации 10–200 мкМ наблюдаются повышение структурной стабильности мембраны и снижение доли гемолизованных эритроцитов.

**Ключевые слова:** эритроциты, пероксид водорода, метгемоглобин, адаптация, гормезис

**DOI:** 10.31857/S0233475522010091

### ВВЕДЕНИЕ

Важным явлением при клеточном дыхании является образование активных форм кислорода (АФК), обладающих широким спектром физиологического и патофизиологического действий. До недавнего времени доминировала точка зрения об исключительно патологической роли АФК, образование которых связывали с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. Однако на сегодняшний день известно, что АФК являются участниками ряда физиологических процессов, среди которых регуляция метаболизма, активация адаптационных механизмов, запуск апоптоза и др. [1–4].

Согласно современным представлениям, пероксид водорода является основной молекулой группы АФК, участвующей в регуляторных процессах [2]. Сигналы, передаваемые пероксидом водорода, характеризуются своим концентрационным порогом активации и длительностью. Действие таких сигналов обратимо, о чем свидетельствует присутствие в клетке особого набора

ферментативных систем, среди которых каталаза (Cat), глутатионпероксидаза (Gpx), пероксиредоксин (Prx) и др. [2, 5–7]. Умеренное повышение концентрации пероксида водорода активирует механизмы, связанные с защитой и адаптацией [2–4]. Благодаря этим механизмам поддерживается баланс образования и утилизации пероксида водорода, а нарушение этого баланса приводит к развитию различных заболеваний [1, 3]. Таким образом, действие пероксида водорода на клетки при низких концентрациях приводит к адаптации и усилению защиты, при высоких — к повреждению клеточных структур. Такое свойство живых систем, описываемое изменением знака биологического эффекта при увеличении величины стрессора, называется гормезисом и объясняется наличием специфических компенсаторно-адаптационных механизмов [8, 9].

Ключевую роль в адаптационных процессах большинства клеток играет фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), активность которого регулируется с участием редокс-зависи-

мого белка Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) [10, 11]. Однако данная система поддержания редокс-гомеостаза отсутствует у эритроцитов, в связи с чем вопрос о механизмах активации адаптационных процессов эритроцитов в условиях окислительного стресса остается открытым.

Эритроциты являются самыми многочисленными клетками в организме человека и выполняют ряд функций, связанных с гомеостазом [9, 12, 13]. Изменения функционального состояния организма, в том числе связанные с нарушением редокс-гомеостаза, будут сказываться на состоянии эритроцитов, что делает необходимым исследование защитных механизмов клеток и поиск способов регуляции их функционирования при окислительном стрессе. В норме концентрация пероксида водорода в крови обычно не превышает 10 мкМ [14]. При патологических процессах внеклеточная концентрация пероксида водорода может повышаться до 200–250 мкМ [15, 16]. Исследование возможных механизмов адаптационного ответа эритроцитов при действии пероксида водорода в диапазоне от 10 до 250 мкМ являлось целью данной работы.

В работе изучена роль пероксида водорода как стимулирующего агента, приводящего к повышению структурной стабильности эритроцитов человека при окислительном гемолизе, опосредованном хлорноватистой кислотой (НОСl). Механизм разрушения клеток под действием НОСl проходит по коллоидно-осмотическому механизму с образованием пор высокой проницаемости [17], следовательно, уменьшение доли негемолитизированных клеток может быть обусловлено повышением структурной стабильности мембраны.

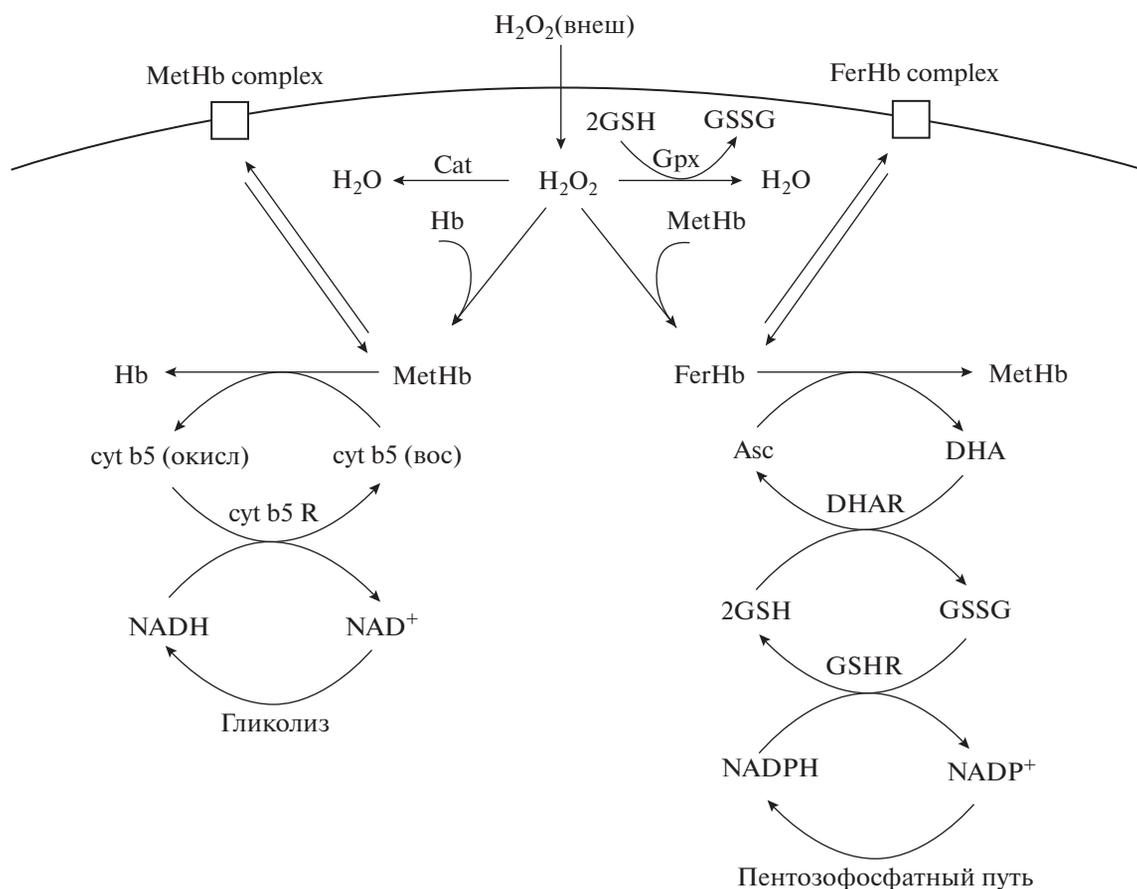
Одним из важнейших механизмов повышения структурной стабильности мембран является их взаимодействие с основным белком эритроцитов — гемоглобином [9]. Гемоглобин является регулятором гомеостаза эритроцитов и ключевым участником внутриклеточных окислительных процессов [9, 12]. Связывание гемоглобина с мембраной регулирует множество внутриклеточных процессов, таких как энергетический метаболизм, деформируемость мембраны, эритроцитоз и др. Связывание проходит с мембранными белками за счет ковалентных и нековалентных взаимодействий или с липидами мембраны в результате гидрофобного взаимодействия [18–21]. Константы скорости образования и распада комплекса гемоглобин–мембрана зависят от состояния гемоглобина [19, 21]. Наиболее высокой константой связывания с компонентами мембраны характеризуется процесс взаимодействия метгемоглобина (MetHb), образующегося при окислении оксигемоглобина, что позволяет предположить его важную роль в регуляции стабильности мембраны. Изучение молекулярных механизмов данного эффекта показа-

ло, что при незначительном и обратимом окислении наблюдается стабилизирующее действие гемоглобина на мембраны, в то время как образование феррилгемоглобинов (FerHb) под действием окислительного стресса нарушает взаимодействие мембраны с цитоскелетом [22]. Таким образом, регуляция окислительного метаболизма гемоглобина может лежать в основе эффекта горемезиса при действии окислителей на эритроциты.

Подтверждение данной гипотезы может быть осуществлено с помощью построения математической модели внутриклеточных процессов на основе известных данных. Начало исследования редокс-метаболизма эритроцитов с использованием математического моделирования можно отнести к 60-м годам прошлого века. В работе Николлса [23] описаны процессы транспорта и утилизации пероксида водорода на основе диффузии и разложения окислителя каталазой. В начале 2000-х моделирование метаболизма пероксида водорода в эритроцитах дополняется сложными процессами, связанными с окислением гемоглобина и переходом его в окисленные формы [6]. Одновременно в работах Киношиты и соавт. [24] были предложены модели для восстановительных процессов, учитывающие вклад нескольких путей восстановления окисленных форм гемоглобина. В свою очередь энергия для восстановления может восполняться только за счет процессов гликолиза, первые модели которого были построены в 80-е годы прошлого века группами Раппопорта–Якобаш [25] в Германии и группой Атауллаханова [26] в СССР. В последующие десятилетия математические модели гликолиза были дополнены и уточнены [24, 27]. В настоящей работе изучено влияние предварительного инкубирования клеток с пероксидом водорода на структурную стабильность эритроцитов при окислительном гемолизе и проведена численная оценка вклада участников метаболизма гемоглобина в регуляцию структурной стабильности мембран.

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

В работе построена математическая модель, описывающая ключевые этапы образования метгемоглобина и феррилгемоглобина при действии внеклеточного пероксида водорода и их связывания с мембраной. Модель включает процессы диффузии и утилизации пероксида водорода в клетке, образование и восстановление метгемоглобина и феррилгемоглобина, образование и распад комплекса гемоглобин–мембрана и образование восстановительных эквивалентов за счет гликолиза. Общая схема процессов представлена на рис. 1. Все уравнения и скорости представлены в табл. 1. Константы и начальные условия указаны в табл. 2 и 3.



**Рис. 1.** Процессы метаболизма эритроцитов с участием пероксида водорода, рассмотренные в модели. Hb – гемоглобин; MetHb – метгемоглобин; FerHb – феррилгемоглобин;  $H_2O_2$  – пероксид водорода;  $H_2O_2$  (внеш) – внеклеточный пероксид водорода; Cat – каталаза; Gpx – глутатионпероксидаза; GSH – глутатион; GSSG – глутатион-дисульфид; cyt b5 (окисл) – окисленная форма цитохрома b5; cyt b5 (вос) – восстановленная форма цитохрома b5; cyt b5 R – цитохром-b5-редуктаза;  $NAD^+/NADH$  – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида; Asc – аскорбиновая кислота; DHA – дегидроаскорбат; DHAR – дегидроаскорбатредуктаза; GSHR – глутатионредуктаза;  $NADP^+/NADPH$  – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата; MetHb complex – мембранный комплекс с метгемоглобином; FerHb complex – мембранный комплекс с феррилгемоглобином.

Скорость изменения концентрации внеклеточного пероксида водорода обусловлена диффузией окислителя в клетки и описывается первым законом Фика для мембран [33]. Диффузия окислителя в клетку и его утилизация обуславливает уменьшение внеклеточной концентрации  $H_2O_2$  ( $v_1$ ), которая прямо пропорциональна количеству клеток в суспензии, и изменение концентрации пероксида водорода во внутриклеточной среде ( $v_2$ ).

В клетке пероксид водорода восстанавливается до воды с участием ферментов Cat и Gpx [7]. При высоких концентрациях пероксида водорода главным участником утилизации является Cat, поскольку ее константа скорости реакции выше, чем у других ферментов и при этом она не требует дополнительных субстратов. Cat при взаимодействии с пероксидом водорода переходит в состояние Comp I ( $v_3$ ), а при взаимодействии со следующей молекулой окислителя она возвращается

обратно в исходное состояние ( $v_4$ ). Дополнительным участником утилизации является Gpx ( $v_5$ ), катализирующая восстановление пероксида водорода внутриклеточным глутатионом (GSH), который также используется для восстановления аскорбиновой кислоты (Asc) [31].

Конкурирующими процессами с участием пероксида водорода будут являться окисление гемоглобина с образованием метгемоглобина ( $v_6$ ) [24, 34–36] и окисление метгемоглобина с образованием феррилгемоглобина ( $v_7$ ) [6]. Скорости данных процессов, согласно закону действующих масс, пропорциональны концентрации участников.

Показано [24], что при повышенных концентрациях метгемоглобина основным путем его восстановления является взаимодействие с цитохромом b5 ( $v_8$ ), который затем восстанавливается NADH с участием фермента цитохром-b5-редуктазы (cyt b5 R) ( $v_9$ ). Восстановление феррилге-

Таблица 1. Реакции и уравнения скорости в модели

| №  | Реакция   | Уравнение скорости   |
|----|---|--|
| 1  | $H_2O_2(\text{внеш}) \rightarrow H_2O_2$  | $v_1 = -P(H_2O_2 - H_2O_2(\text{внеш})) \frac{S_{\text{клет}}}{V} N_{\text{клет}}$   |
| 2  | $H_2O_2(\text{внеш}) \rightarrow H_2O_2$  | $v_2 = -P(H_2O_2 - H_2O_2(\text{внеш})) \frac{S_{\text{клет}}}{V_{\text{клет}}}$   |
| 3  | $H_2O_2 \xrightarrow{\text{Cat}} H_2O$  | $v_3 = k_3 \cdot \text{Cat} \cdot H_2O_2$  |
| 4  | $H_2O_2 \xrightarrow{\text{Compl}} H_2O + O_2$  | $v_4 = k_4 \cdot \text{Compl} \cdot H_2O_2$  |
| 5  | $H_2O_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{Gpx}} 2H_2O + \text{GSSG}$   | $v_5 = \frac{\text{Gpx} \cdot \text{GSH} \cdot H_2O_2}{K_1 \cdot H_2O_2 + K_2 \cdot \text{GSH}}$   |
| 6  | $2\text{Hb} + H_2O_2 \rightarrow 2\text{MetHb} + H_2O$  | $v_6 = k_6 \cdot \text{Hb} \cdot H_2O_2$   |
| 7  | $\text{MetHb} + H_2O_2 \rightarrow \text{FerHb} + H_2O$   | $v_7 = k_7 \cdot \text{MetHb} \cdot H_2O_2$  |
| 8  | $\text{MetHb} + \text{cytb5}(\text{вос}) \rightarrow \text{Hb} + \text{cytb5}(\text{окис})$                   | $v_8 = k_8 \cdot \text{MetHb} \cdot \text{cytb5}(\text{вос})$  |
| 9  | $\text{NADH} + \text{cytb5}(\text{окис}) \xrightarrow{\text{cytb5R}} \text{NAD}^+ + \text{cytb5}(\text{вос})$ | $v_9 = k_9 \cdot \text{cytb5R} \frac{\text{NADH}}{K_M^{\text{NADH}} + \text{NADH}} \times$<br>$\times \frac{\text{cytb5}(\text{окис})}{K_M^{\text{cytb5}(\text{окис})} + \text{cytb5}(\text{окис})}$ |
| 10 | $\text{FerHb} + 2\text{Asc} \rightarrow \text{MetHb} + \text{DHA} + \text{Asc}$                               | $v_{10} = k_{10} \cdot \text{FerHb} \cdot \text{Asc}$  |
| 11 | $\text{DHA} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{DHAR}} \text{Asc} + \text{GSSG}$                                 | $v_{11} = \frac{k_{13} \cdot \text{DHAR}}{1 + \frac{K_{\text{DHA}}}{\text{DHA}} + \frac{K_{\text{GSH}}}{\text{GSH}}}$  |
| 12 | $\text{GSSG} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GSHR}} \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$                            | $v_{12} = \frac{\text{GSHR} \cdot \text{GSSG} \cdot \text{NADPH}}{K_1 \cdot \text{NADPH} + K_2 \cdot \text{GSH}}$  |
| 13 | $\text{MetHb} + \text{Band3} \rightarrow \text{MetHbcomplex}$   | $v_{13} = k_{13} \cdot \text{MetHb} \cdot \text{Band3}$  |
| 14 | $\text{MetHbcomplex} \rightarrow \text{MetHb} + \text{Band3}$   | $v_{14} = k_{14} \cdot \text{MetHbcomplex}$  |
| 15 | $\text{FerHb} + \text{Band3} \rightarrow \text{FerHbcomplex}$   | $v_{15} = k_{15} \cdot \text{FerHb} \cdot \text{Band3}$  |
| 16 | $\text{FerHbcomplex} \rightarrow \text{FerHb} + \text{Band3}$   | $v_{16} = k_{16} \cdot \text{FerHbcomplex}$  |

моглобина осуществляется клеточными антиоксидантами без участия ферментов. В модели учитывается реакция феррилгемоглобина с Asc, поскольку ее константа реакции имеет наиболее высокое значение ( $v_{10}$ ). При восстановлении аскорбата образуются радикалы, которые быстро дисмутируют до дегидроаскорбата (DHA) в прямой реакции или с участием ферментов [37].

В работе построена полная модель гликолиза и пентозофосфатного пути, вид уравнений которой представлен в приложении к статье. Основной вклад в регуляцию состояния редокс-пары  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  вносят реакции с участием ферментов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и лактатдегидрогеназы (LDH) [24, 32, 38]. Первая реакция является одной из стадий гликолиза, она катализирует окисление глицеральдегид-3-фосфата (gap) с образованием 1,3-дифосфоглицерата (13pg) и выделением NADH. Вторая катализирует

превращение пирувата (pyg) в лактат (lac) с выделением  $\text{NAD}^+$ . При физиологических условиях данная реакция проходит в направлении образования лактата и  $\text{NAD}^+$ , тем самым используя электроны, высвобождаемые в первой реакции. Благодаря этому в эритроцитах наблюдается отношение концентраций [пируват] : [лактат] = 1 : 15, а отношение  $[\text{NADH}] : [\text{NAD}^+] = 1 : 600$  [24, 32]. При снижении концентрации NADH равновесие нарушается, что приводит к тому, что LDH начинает катализировать обратную реакцию для восстановления баланса.

Регуляция редокс-пары Asc/DHA осуществляется с участием электронов GSH ферментом дегидроаскорбатредуктазой (DHAR) ( $v_{11}$ ) [31]. В результате этой реакции образуется глутатиондисульфид (GSSG), который восстанавливается ферментом глутатионредуктазой (GSHR) ( $v_{12}$ ) с участием электронов NADPH. Восстановление

NADPH проходит в пентозофосфатном пути с участием ферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PDH) и фосфоглюконатдегидрогеназы (G6P6DH) [33, 38].

Образование метгемоглобина приводит к его взаимодействию с мембраной эритроцитов, а именно к связыванию с белком полосы 3 (Band 3) [12, 20]. Для моделирования данного процесса рассматривается кинетика лиганд-рецепторного связывания [33]. В качестве лиганда выступает метгемоглобин, а рецептором служит мембранный белок Band 3. Образование комплекса является обратимым и характеризуется константами образования и распада комплекса ( $v_{13}, v_{14}$ ). Избыток пероксида водорода приводит к образованию феррилгемоглобина, который также способен связываться с мембраной эритроцитов. Данный процесс рассматривается аналогично предыдущему со скоростями ( $v_{15}, v_{16}$ ).

Построенная математическая модель является нелинейной и содержит 41 дифференциальное уравнение. Принципиально новым является учет динамики процесса, что позволяет изучать не только амплитуды, но и длительности действия сигналов. Все константы и начальные условия взяты из литературных источников. Выполнен анализ на устойчивость системы. Численное решение системы выполнено в программе Wolfram Mathematica. Полный вид дифференциальных уравнений представлен в приложении к статье.

На основе численного моделирования процессов взаимодействия метгемоглобина с мембраной эритроцитов можно установить область концентраций внеклеточного пероксида водорода, при которых будет наблюдаться активация адаптационных процессов, что позволяет проведение экспериментальной проверки. Влияние пероксида водорода на структурную стабильность мембран исследовали в экспериментах *in vitro* при гемолизе эритроцитов, индуцированном хлорноватистой кислотой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали гипохлорит натрия (NaOCl) (Sigma-Aldrich) и пероксид водорода (Белмедпрепараты, Беларусь).

Концентрацию раствора NaOCl определяли спектрофотометрически, как концентрацию OCl<sup>-</sup> при pH 12.0, коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon_{292}$ ) равен  $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Поскольку  $pK_a$  для HOCl  $\sim 7.5$  при физиологических pH, половина соединения присутствует в протонированной форме HOCl и половина в депротонированной форме OCl<sup>-</sup>. Таким образом, под термином HOCl понимается смесь HOCl/OCl<sup>-</sup>. Рабочий раствор HOCl готовили непосредственно перед анализом путем

**Таблица 2.** Значения параметров в модели

| №  | Константа реакции из табл. 1  | Источник |
|----|---|----------|
| 1  | $P = 6 \times 10^{-6} \text{ M c}^{-1}$<br>$S_{\text{клет}} = 1.09 \times 10^{-10} \text{ M}^2$<br>$V = 10^{-6} \text{ M}^3$<br>$N_{\text{клет}} = 3 \times 10^7$                             | [28, 29] |
| 2  | $P = 6 \times 10^{-6} \text{ M c}^{-1}$<br>$S_{\text{клет}} = 1.09 \times 10^{-10} \text{ M}^2$<br>$V_{\text{клет}} = 6.3 \times 10^{-17} \text{ M}^3$  | [28, 29] |
| 3  | $k_3 = 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$   | [6]      |
| 4  | $k_4 = 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$   | [6]      |
| 5  | $G_{\text{px}} = 1.4 \times 10^{-6} \text{ M}$<br>$K_1 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M c}$<br>$K_2 = 2.4 \times 10^{-8} \text{ M c}$  | [7]      |
| 6  | $k_6 = 100 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$   | [6]      |
| 7  | $k_7 = 98 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  | [30]     |
| 8  | $k_8 = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  | [24]     |
| 9  | $k_9 = 418 \text{ c}^{-1}$<br>$\text{cytb5R} = 7 \times 10^{-8} \text{ M}$<br>$K_M^{\text{NADH}} = 3.1 \times 10^{-7} \text{ M}$<br>$K_M^{\text{cytb5(окис)}} = 1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ | [24]     |
| 10 | $k_{10} = 400 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  | [30]     |
| 11 | $k_{11} = 5.27 \text{ c}^{-1}$<br>$\text{DHAR} = 10^{-7} \text{ M}$<br>$K_{\text{DNA}} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ M}$<br>$K_{\text{GSH}} = 3.5 \times 10^{-3} \text{ M}$                     | [31]     |
| 12 | $\text{GSHR} = 1.4 \times 10^{-6} \text{ M}$<br>$K_1 = 2.4 \times 10^{-8} \text{ M c}$<br>$K_2 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M c}$  | [7]      |
| 13 | $k_{13} = 3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  | [12]     |
| 14 | $k_{14} = 7.8 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$  | [12]     |
| 15 | $k_{15} = 30 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$   | [21]     |
| 16 | $k_{16} = 0.8 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$  | [21]     |

**Таблица 3.** Начальные значения параметров в модели

| Обозначение реагента                 | Начальное значение         | Источник      |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (внеш) | 0–2.5 × 10 <sup>-4</sup> М | Данная работа |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 0                          | Данная работа |
| Cat                                  | 5.5 × 10 <sup>-6</sup> М   | [7]           |
| Comp I                               | 5.5 × 10 <sup>-6</sup> М   | [7]           |
| Hb                                   | 0.01 М                     | [24]          |
| MetHb                                | 0                          | [24]          |
| FerHb                                | 0                          | [30]          |
| cyt b5(вос)                          | 8.12 × 10 <sup>-7</sup> М  | [24]          |
| cyt b5(окисл)                        | 0                          | [24]          |
| NADH                                 | 1.48 × 10 <sup>-7</sup> М  | [32]          |
| NAD <sup>+</sup>                     | 8.9 × 10 <sup>-5</sup> М   | [32]          |
| Asc                                  | 7.5 × 10 <sup>-5</sup> М   | [1]           |
| DHA                                  | 0                          | [1]           |
| GSH                                  | 1.5 × 10 <sup>-3</sup> М   | [7]           |
| GSSG                                 | 0                          | [7]           |
| NADPH                                | 5 × 10 <sup>-5</sup> М     | [7]           |
| NADP <sup>+</sup>                    | 0.2 × 10 <sup>-6</sup> М   | [7]           |
| Band 3                               | 2.6 × 10 <sup>-5</sup> М   | [33]          |
| complex MetHb                        | 0                          | [12]          |
| complex FerHb                        | 0                          | [21]          |

растворения препарата в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7.4), содержащем 137 мМ NaCl.

В эксперименте использовали кровь здоровых доноров, полученную в ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий”. Эритроциты выделяли и промывали путем центрифугирования при 300 g в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 5 мМ D-глюкозы (рН 7.4).

Кинетики гемолиза эритроцитов измеряли с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь) путем регистрации оптической плотности клеточной суспензии (3 × 10<sup>7</sup> клеток/мл) на длине волны 640 нм. Концентрация эритроцитов выбрана таким образом, чтобы начальная оптическая плотность составляла 0.5, что является наиболее оптимальной для измерения. В измерительную кювету добавляли 1 мл суспензии отмытых эритроцитов и термостатировали в течение 3–4 мин при температуре 37°C при постоянном перемешивании. Гемолиз инициировали путем добавления 0.2 мМ HOCl к

суспензии эритроцитов в ФСБ при предварительном инкубировании с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 5 и 15 мин при концентрациях 10–250 мкМ.

Оценка эффекта (*I*) определялась как относительная разность оптической плотности после 10 мин инкубирования с хлорноватистой кислотой в присутствии пероксида водорода и оптической плотности после 10 мин инкубирования с хлорноватистой кислотой без пероксида водорода.

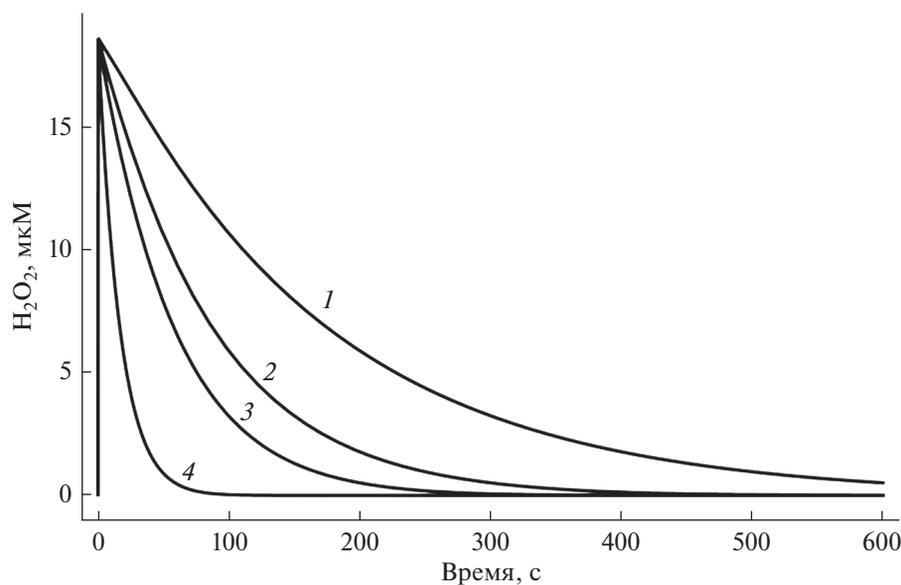
Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для трех–пяти независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенная модель позволила вычислить динамику внутриклеточных сигнальных процессов с участием метгемоглобина и феррилгемоглобина в зависимости от величины внеклеточной концентрации пероксида водорода. Ниже представлены результаты численных экспериментов на основе построенной модели.

В результате диффузии и действия каталазы происходит быстрое (порядка секунды) установление градиента концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на плазматической мембране. Величина внутриклеточной концентрации пероксида водорода зависит от величины внеклеточной концентрации, которая снижается в результате утилизации окислителя клетками. Утилизация, а следовательно, и динамика изменения внеклеточной и внутриклеточной концентраций пероксида водорода пропорциональна количеству клеток в суспензии. На рис. 2 представлена динамика внутриклеточного пероксида водорода при внеклеточной концентрации 200 мкМ и различном количестве эритроцитов в растворе. Следствием утилизации окислителя является экспоненциальное снижение величин внутриклеточной и внеклеточной концентрации. Из рис. 2 также видно, что при концентрации порядка 200 мкМ и количестве клеток 3 × 10<sup>7</sup> общее время действия сигнала пероксида водорода не превышает 300 с, а внутриклеточная концентрация не превышает 10% от внеклеточной концентрации, что согласуется с данными полученными в работе [23].

Рост внутриклеточной концентрации пероксида водорода приводит к увеличению образования метгемоглобина (рис. 3а), количество которого достигает значений 2–3 мМ. Полученные значения подтверждаются результатами экспериментальных исследований, представленных в работе [39]. Метгемоглобин, образуя комплексы с



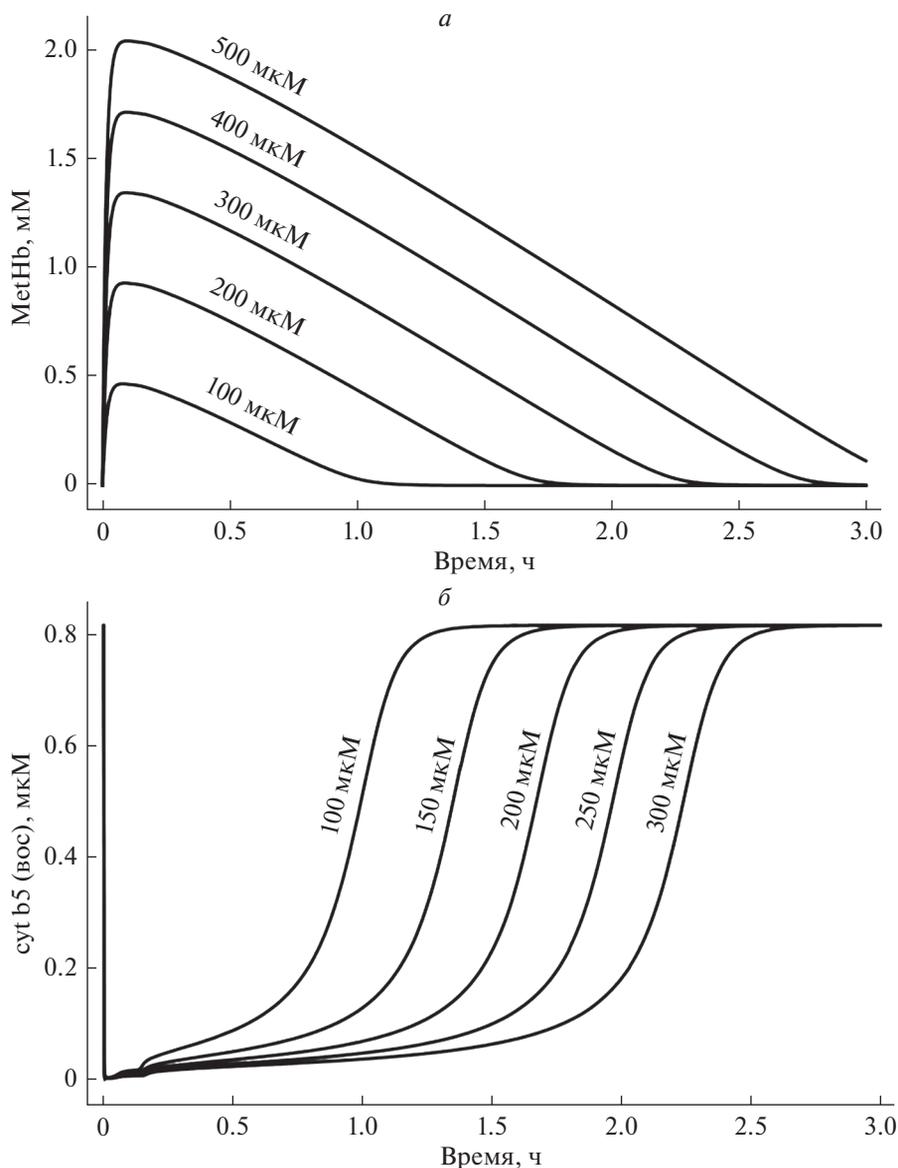
**Рис. 2.** Кинетика утилизации внутриклеточного пероксида водорода при различном количестве клеток в кювете (1 —  $1 \times 10^7$ , 2 —  $2 \times 10^7$ , 3 —  $3 \times 10^7$ , 4 —  $10^8$ ).

белками цитоскелета, индуцирует стабилизацию мембраны и повышение структурной стабильности [9, 40]. Снижение концентрации метгемоглобина в результате его восстановления ферментом цитохромом b5 приводит к распаду мембранных комплексов метгемоглобина. Общее время восстановления метгемоглобина для концентрации пероксида водорода 200–300 мкМ составляет 2–3 часа в модели, что сопоставимо со временем, приводимым в работе [39]. Динамика изменения концентрации цитохрома b5, используемого для восстановления окисленного гемоглобина, зависит от концентрации  $H_2O_2$  и при концентрациях окислителя, превышающих 100 мкМ, количество восстановленного белка снижается до нулевых значений, что увеличивает время восстановления метгемоглобина (рис. 3б). Увеличение скорости восстановления NADH при повышении внеклеточной концентрации лактата (что может наблюдаться при мышечных нагрузках, гипоксии и ряде патологических процессов) будет ускорять процесс восстановления метгемоглобина.

Дальнейшее увеличение количества внеклеточного  $H_2O_2$  будет приводить к окислению метгемоглобина и образованию феррилгемоглобина, который также способен связываться с мембраной клетки. Количество образованного феррилгемоглобина зависит от количества поступившего пероксида водорода и количества образованного метгемоглобина. В работе [41] представлены данные экспериментов по количеству феррилгемоглобина при отношении  $[H_2O_2] : [MetHb] = 10 : 1$  и указывается на полное окисление метгемоглобина. В наших экспериментах данное отношение

не поднималось выше 1 : 1 и модель предсказывала окисление 5% метгемоглобина. Образование комплекса феррилгемоглобина с мембраной эритроцита нарушает ее взаимодействие с цитоскелетом, что приводит к снижению структурной стабильности клетки [21]. На рис. 4а представлена зависимость количества образованного феррилгемоглобина от концентрации внеклеточного пероксида водорода. При достижении 250 мкМ  $H_2O_2$  наблюдается увеличение интенсивности образования феррилгемоглобина, что связано с истощением внутриклеточного пула аскорбата (рис. 4б). Учет гликолиза в модели показывает, что при гипогликемии будет наблюдаться замедление образования NADH и NADPH, что будет приводить к накоплению окисленных форм гемоглобина и увеличению количества мембранных комплексов феррилгемоглобина.

В рамках предложенной модели адаптационного механизма степень увеличения структурной стабильности мембраны зависит от количества образованных комплексов мембрана–метгемоглобин и мембрана–феррилгемоглобин. Доля занятых тем или иным белком рецепторов, в свою очередь, зависит от величины внеклеточной концентрации пероксида водорода и времени инкубирования. На рис. 5 представлены теоретически рассчитанные зависимости доли образованных мембранных комплексов белков от внеклеточной концентрации пероксида водорода. Зависимость относительной разности количества комплексов мембрана–метгемоглобин и мембрана–феррилгемоглобин от концентрации окислителя имеет куполообразный вид (рис. 6). При концентрациях

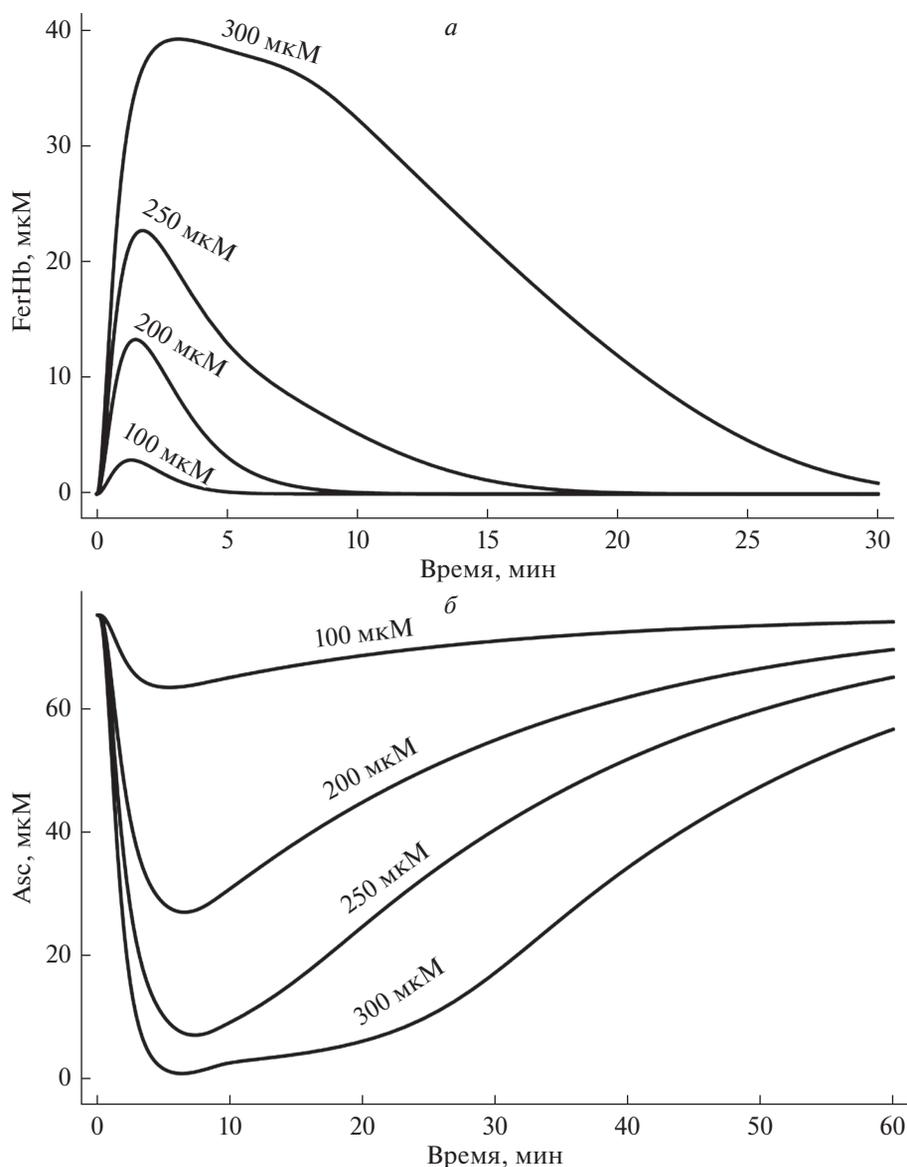


**Рис. 3.** Кинетика образования и восстановления метгемоглобина (MetHb) (а) и цитохрома b5(вос) (б) при различной концентрации внеклеточного пероксида водорода.

пероксида водорода, не превышающих 200  $\mu M$ , в клетке наблюдается увеличение количества комплексов с метгемоглобином с ростом концентрации. Увеличение времени инкубирования с 5 до 15 мин также приводит к росту числа мембранных комплексов, образованных метгемоглобином. При более высоких концентрациях окислителя доля образованных мембранных комплексов с метгемоглобином уменьшается. Превышение концентрации 200  $\mu M$  индуцирует резкий рост количества комплексов феррилгемоглобин–мембрана, что связано с уменьшением числа молекул восстановителей. При достижении концентрации  $H_2O_2$  800  $\mu M$  количество комплексов сравнивается. Таким образом, согласно данной моде-

ли при действии внеклеточного  $H_2O_2$  в концентрации от 10 до 200  $\mu M$  будет наблюдаться дозозависимое увеличение количества комплексов мембрана–метгемоглобин, а следовательно, и повышение структурной стабильности мембраны.

В экспериментах по исследованию скорости гемолиза эритроцитов показано, что предварительное инкубирование клеток с пероксидом водорода в концентрациях 10–200  $\mu M$  действительно позволяет снизить долю гемолизированных эритроцитов. Максимальный защитный эффект, как и предсказывала модель (рис. 6), зависит от времени инкубирования клеток с окислителем. На рис. 7 представлены зависимости доли неразрушенных эритроцитов от внеклеточной концен-



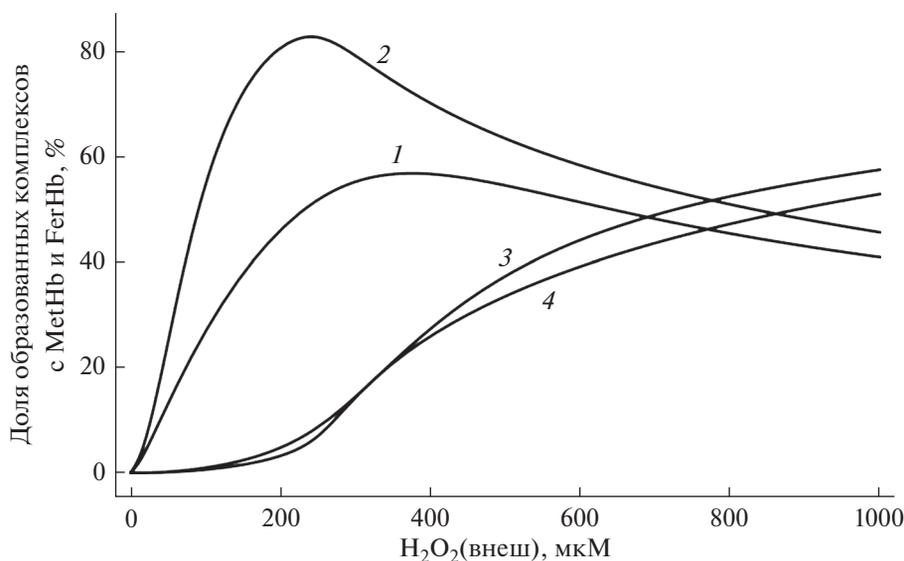
**Рис. 4.** Кинетика образования и восстановления феррилгемоглобина (FerHb) (а) и аскорбата (б) при различной концентрации внеклеточного пероксида водорода.

трации пероксида водорода для различных времен инкубирования, которые составили 5 и 15 мин. При предварительном инкубировании клеток в течение 5 мин наблюдается стабилизирующий эффект, достигающий 30% от контрольных значений. При инкубировании клеток в течение 15 мин с пероксидом водорода наблюдается более выраженный стабилизирующий эффект: доля неразрушенных эритроцитов достигает 60% для пероксида водорода в концентрации 175 мкМ. Однако при более высоких концентрациях проявляется обратная зависимость: с увеличением концентрации окислителя снижается доля неразрушенных эритроцитов, что, вероятно, обусловлено ростом количества комплексов феррилгемогло-

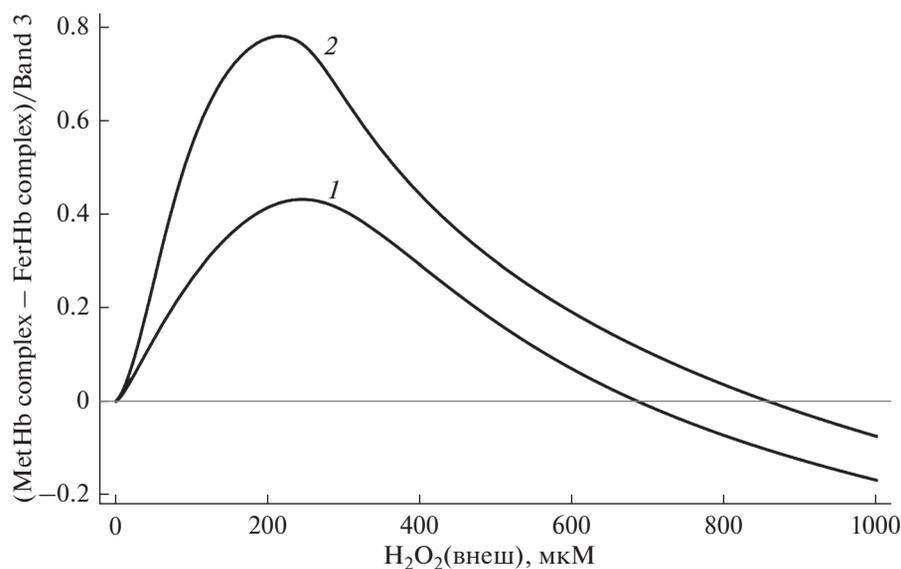
бин–мембрана. Увеличение количества этих комплексов может инициировать процессы перекисного окисления липидов и нарушить взаимодействие цитоскелета с мембраной, что приводит к снижению эффекта увеличения структурной стабильности при высоких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построение адекватной математической модели адаптационного механизма эритроцитов способствует анализу оптимальных условий его регуляции внешними факторами. В работе построена математическая модель, учитывающая вклад различных участников метаболизма гемо-



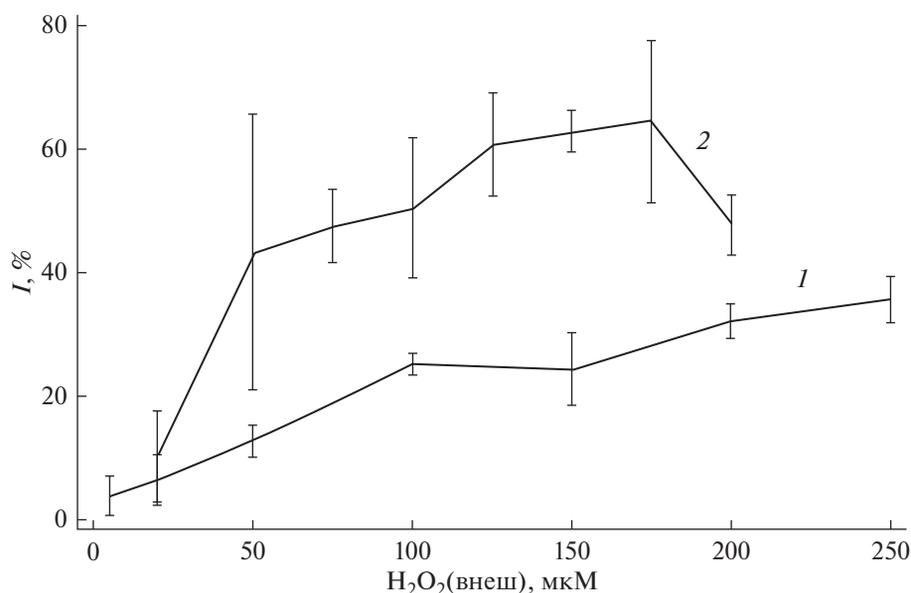
**Рис. 5.** Доля образованных комплексов метгемоглобин–мембрана (1 – 5 мин, 2 – 15 мин предварительного инкубирования) и доля комплексов феррилгемоглобин–мембрана (3 – 5 мин, 4 – 15 мин предварительного инкубирования) в зависимости от концентрации внеклеточного пероксида водорода.



**Рис. 6.** Относительная разность количества образованных комплексов метгемоглобин–мембрана и феррилгемоглобин–мембрана для различной концентрации внеклеточного пероксида водорода (1 – 5 мин, 2 – 15 мин предварительного инкубирования).

глобина в регуляцию структурной стабильности мембраны. Результаты численного моделирования показывают, что обратимое связывание метгемоглобина с мембраной может являться адаптивным механизмом, направленным на стабилизацию липидного бислоя мембраны. С другой стороны, рост концентрации более окисленной формы гемоглобина – феррилгемоглобина, и его связывание с мембраной приводит к усилению патофизиологических процессов (перекисное

окисление липидов, нарушение взаимодействия мембраны с цитоскелетом и др.), снижающих структурную стабильность клеток. Соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина, по-видимому, определяет гормональную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода: регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких. При анализе оптимальных условий в модели учитывается величина внеклеточной концен-



**Рис. 7.** Доля негемолизированных эритроцитов в зависимости от концентрации внеклеточного пероксида водорода (1 – 5 мин, 2 – 15 мин предварительного инкубирования).

трации пероксида водорода, число клеток в растворе, состояние антиокислительной системы эритроцитов (содержание аскорбата и других восстановителей), метаболическая активность клеток (гликолиз, пентозофосфатный путь) и внешние метаболические условия (содержание лактата). В результате теоретических и экспериментальных исследований показано, что при действии пероксида водорода в концентрации 10–200 мкМ активируется адаптационный механизм эритроцитов, обусловленный ростом числа мембранно-связанного метгемоглобина, что повышает структурную стабильность мембраны при окислительном стрессе. Полученные данные позволяют расширить представления о механизмах защиты эритроцитов, построить прогнозы о защитных свойствах клеток при окислительном стрессе.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20У-1).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. 2008. *Окислительно-восстановительные процессы в клетках*. Минск: БГУ. 159 с.
2. Sies H., Jones D.P. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21** (3), 1–21.
3. Ghezzi P., Jaquet V., Marcucci F., Schmidt H. 2017. The oxidative stress theory of disease: Levels of evidence and epistemological aspects. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1784–1796.
4. Ursini F., Maiorino M., Forman H.J. 2016. Redox homeostasis: The golden mean of healthy living. *Redox Biology.* **8**, 205–215.
5. Lim J.B., Huang B.K., Deen W.M., Sikes H.D. 2015. Analysis of the lifetime and spatial localization of hydrogen peroxide generated in the cytosol using a reduced kinetic model. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 47–53.
6. Johnson R.M., Goyette G.Jr., Ravindranath Y., Ho Y. 2005. Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1407–1417.
7. Orrico F., Möller M.N., Cassina A., Denicola A., Thomson L. 2018. Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption by red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **121**, 231–239.
8. Merry T.L., Ristow M. 2015. Mitohormesis in exercise training. *Free Radic. Biol. Med.* (11), 123–130.
9. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. 2019. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор). *Прикл. биохим. и микробиол.* **55** (2), 107–123.
10. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Кандалинцева Н.В., Мартинович Г.Г., Меньшикова Е.Б. 2017. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия.* **82** (5), 749–759.
11. Cuadrado A., Rojo A., Wells G., Hayes J., Cousin S., Rumsey W., Attucks O., Franklin S., Levonen A.,

- Kensler T., Dinkova-Kostova A. 2019. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 295–317.
12. Arashiki N., Kimata N., Manno S., Mohandas N., Takakuwa Y. 2013. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: Mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry*. **52**, 5760–5769.
13. Kuhn V., Diederich L., Stevenson Keller IV T.C., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. 2017. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxid. Redox Signal.* **26** (13), 718–742.
14. Forman H.J., Bernardo A., Davies K.J.A. 2016. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch. Biochem. Biophys.* **603**, 48–53.
15. Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K., Sen C.K. 2006. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.* **13** (1), 211–220.
16. Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. **459** (7249), 996–999.
17. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Zavodnik L.B., Soszynski M., Bartosz G., Bryszewska M. 2002. Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: Effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. *Bioelectrochemistry*. **58**, 127–135.
18. Liu S., Palek J. 1984. Hemoglobin enhances the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **259** (18), 11556–11562.
19. Snyder L.M., Fortier N.L., Trainor J., Jacobs J., Lob L., Lubin B., Chiu D., Shohet S., Mohandas N. 1985. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J. Clin. Invest.* **76**, 1971–1977.
20. Kaul R.K., Köhler H. 1983. Interaction of hemoglobin with Band 3: A Review. *Klin. Wochenschr.* **61**, 831–837.
21. 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.
22. Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Palek J. 1990. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: Correlation with a release of hemin. *Blood*. **76**, 2125–2131.
23. Nicholls P. 1965. Activity of catalase in the red cell. *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 286–297.
24. Kinoshita A., Nakayama Y., Kitayama T., Tomita M. 2007. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *FEBS J.* **274**, 1449–1458.
25. Rapoport T.A., Heinrich R., Jacobasch G., Rapoport S. 1974. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **42**, 107–120.
26. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., 1977. Количественная модель гликолиза в эритроцитах человека. *Биофизика*. **22** (3), 483–488.
27. Mulquiney P.J., Kuchel P.W. 1999. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: Equations and parameter refinement. *Biochem. J.* **342**, 581–596.
28. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. 2005. Утилизация пероксида водорода эпителиальными клетками амниона человека. *Биомед. химия*. **51** (6), 626–633.
29. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. 2004. Система красной крови: Сравнительная физиология. Белгород: Изд-во БелГУ, 216 с.
30. Gebicka L., Banasiak E. 2009. Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin. *Acta Biochim. Pol.* **56** (3) 509–513.
31. Peng Xu D., Washburn M.P., Ping Sun G., Wells W. 1996. Purification and characterization of a glutathione dependent dehydroascorbate reductase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221** (1), 117–121.
32. Bali M., Thomas S.R. 2001. A modelling study of feed-forward activation in human erythrocyte glycolysis. *C. R. Acad. Sci. III.* **324**, 185–199.
33. Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г., Хмельницкий А.И. 2008. *Биол. мембраны*. Минск: БГУ. 184 с.
34. Miłek J. 2018. Estimation of the kinetic parameters for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzymatic decomposition and for catalase deactivation. *Braz. J. Chem. Eng.* **35** (3), 995–1004.
35. Benfeitas R., Selvaggio G., Antunes F., Coelho P.M.B.M., Salvador A. 2014. Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: A validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II. *Free Radic. Biol. Med.* **74**, 35–49.
36. Kanas T., Acker J.P. 2010. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* **277**, 343–356.
37. May J.M., Qu Z., Cobb C.E. 2004. Human erythrocyte recycling of ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* **279** (15), 14975–14982.
38. Мартинович Г.Г., Сазанов Л.А., Черенкевич С.Н. 2017. *Клеточная биоэнергетика: физико-химические и молекулярные основы*. М.: ЛЕНАНД. 196 с.
39. Jaffe E.R. 1963. The reduction of methemoglobin in erythrocytes of a patient with congenital methemoglobinemia, subjects with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and normal individuals. *Blood*. **21** (5), 561–572.
40. Mendanha S.A., Anjos J.L.V., Silva A.H.M., Alonso A. 2012. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **45**, 473–481.
41. Kassa T., Jana S., Meng F., Alayash A.I. 2016. Differential heme release from various hemoglobin redox states and the upregulation of cellular heme oxygenase-1. *FEBS Open Bio.* **6**, 876–884.

Ниже представлена система дифференциальных уравнений, исследуемая в статье. В данном виде система представлена в программе Wolfram Mathematica

|  |  |
|--|--|
| $glc'[t] = vGLUT - vHK$                                    | $glc[0] = 5 \times 10^{-3}$                |
| $g6p'[t] = vHK - vPGI - vG6PDH$                            | $g6p[0] = 6 \times 10^{-5}$                |
| $f6p'[t] = vPGI - vPFK + vTA + vTK2$                       | $f6p[0] = 1.9 \times 10^{-5}$              |
| $fdp'[t] = vPFK - vALD$                                    | $fdp[0] = 5.6 \times 10^{-6}$              |
| $dhap'[t] = vALD - vTPI$                                   | $dhap[0] = 1.5 \times 10^{-5}$             |
| $ga3p'[t] = vALD + vTPI - vGAPDH - vTA + vTK1$<br>$+ vTK2$ | $ga3p[0] = 3.6 \times 10^{-6}$             |
| $b13pg'[t] = vGAPDH - vPGK$                                | $b13pg[0] = 2.3 \times 10^{-7}$            |
| $p3g'[t] = vPGK - vPGM$                                    | $p3g[0] = 4.8 \times 10^{-5}$              |
| $p2g'[t] = vPGM - vEN$                                     | $p2g[0] = 1.4 \times 10^{-5}$              |
| $pep'[t] = vEN - vPK$                                      | $pep[0] = 8.1 \times 10^{-6}$              |
| $pyr'[t] = vPK - vLDH - vpyrtr$                            | $pyr[0] = 5.2 \times 10^{-5}$              |
| $lac'[t] = vLDH - vlactr$                                  | $lac[0] = 1.3 \times 10^{-3}$              |
| $ATP'[t] = -vHK - vPFK + vPGK + vPK$                       | $ATP[0] = 1.4 \times 10^{-3}$              |
| $ADP'[t] = vHK + vPFK - vPGK - vPK$                        | $ADP[0] = 1.5 \times 10^{-4}$              |
| $gl6p'[t] = vG6PDH - vPGLase$                              | $gl6p[0] = 3.6 \times 10^{-4}$             |
| $go6p'[t] = vPGLase - v6PGODH$                             | $go6p[0] = 4.5 \times 10^{-5}$             |
| $ru5p'[t] = v6PGODH - vX5PI - vR5PI$                       | $ru5p[0] = 4.9 \times 10^{-6}$             |
| $x5p'[t] = vX5PI - vTK1 - vTK2$                            | $x5p[0] = 9 \times 10^{-6}$                |
| $r5p'[t] = vR5PI - vTK1$                                   | $r5p[0] = 5.8 \times 10^{-6}$              |
| $s7p'[t] = vTK1 - vTA$                                     | $s7p[0] = 2.1 \times 10^{-5}$              |
| $e4p'[t] = vTA - vTK2$                                     | $e4p[0] = 4.5 \times 10^{-7}$              |
| $Cat1'[t] = -v3 + v4$                                      | $Cat1[0] = 5.5 \times 10^{-6}$             |
| $Cat2'[t] = v3 - v4$                                       | $Cat2[0] = 5.5 \times 10^{-6}$             |
| $H2O2ex'[t] = -v1$   | $H2O2ex[0] = (1 \dots 250) \times 10^{-6}$ |
| $H2O2'[t] = v2 - v3 - v4 - v5 - v6 - v7$                   | $H2O2[0] = 0$                              |
| $cytb5r'[t] = -v8 + v9$                                    | $cytb5r[0] = 8.1 \times 10^{-6}$           |
| $cytb5ox'[t] = v8 - v9$                                    | $cytb5ox[0] = 0$                           |
| $metHb'[t] = v6 - v7 - v8 - v13 + v10 + v14$               | $metHb[0] = 0$                             |
| $ferHb'[t] = v7 - v10 - v15 + v16$                         | $ferHb[0] = 0$                             |
| $metHbcomplex'[t] = v13 - v14$                             | $metHbcomplex[0] = 0$                      |
| $ferHbcomplex'[t] = v15 - v16$                             | $ferHbcomplex[0] = 0$                      |
| $B3'[t] = -v13 + v14 - v15 + v16$                          | $B3[0] = 2.6 \times 10^{-5}$               |
| $Hb'[t] = -v6 + v8$  | $Hb[0] = 0.01$                             |
| $Asc'[t] = -v10 + v11$                                     | $Asc[0] = 7.5 \times 10^{-5}$              |
| $DHA'[t] = v10 - v11$                                      | $DHA[0] = 0$                               |
| $GSH'[t] = 2 \times (-v5 - v11 + v12)$                     | $GSH[0] = 1.5 \times 10^{-3}$              |
| $GSSG'[t] = v5 + v11 - v12$                                | $GSSG[0] = 0$                              |
| $NADP'[t] = -vG6PDH - v6PGODH + v12$                       | $NADP[0] = 0.2 \times 10^{-6}$             |
| $NADPH'[t] = vG6PDH + v6PGODH - v12$                       | $NADPH[0] = 5 \times 10^{-5}$              |
| $NAD'[t] = -vGAPDH + vLDH - v9$                            | $NAD[0] = 8.9 \times 10^{-5}$              |
| $NADH'[t] = vGAPDH - vLDH + v9$                            | $NADH[0] = 1.5 \times 10^{-7}$             |

$$\begin{aligned}
 vGLUT &= \frac{0.0207}{1 + \frac{1.7 \times 10^{-3} \times (glcex - glc[t])}{glcex} + \frac{glc[t]}{6.9 \times 10^{-3}} + 0.54 \times \frac{glcex \times glc[t]}{1.7 \times 6.9 \times 10^{-6}}} ; \quad vPGI = 2.18 \times 10^{-7} \times \frac{1470 \times g6p[t]}{1.81 \times 10^{-4}} - \frac{1760 \times f6p[t]}{7.1 \times 10^{-5}} ; \quad vTPI = 1.14 \times 10^{-6} \times \frac{1280 \times dhap[t]}{1.62 \times 10^{-4}} - \frac{14560 \times ga3p[t]}{4.46 \times 10^{-4}} \\
 &+ \frac{1}{1 + \frac{g6p[t]}{1.81 \times 10^{-4}} + \frac{f6p[t]}{7.1 \times 10^{-5}}} + \frac{dhap[t]}{1.62 \times 10^{-4}} + \frac{ga3p[t]}{4.46 \times 10^{-4}} \\
 vHK &= 2.4 \times 10^{-8} \times \frac{180 \times ATP[t] \times glc[t]}{4.7 \times 10^{-5} \times 10^{-3}} - \frac{1.16 \times g6p[t] \times ADP[t]}{10^{-3} \times 4.7 \times 10^{-5}} ; \\
 &+ \frac{ATP[t]}{10^{-3}} + \frac{glc[t]}{4.7 \times 10^{-5}} + \frac{ADP[t]}{10^{-3}} + \frac{ATP[t] \times glc[t]}{10^{-3} \times 4.7 \times 10^{-5}} + \frac{g6p[t] \times ADP[t]}{10^{-3} \times 4.7 \times 10^{-5}} ; \\
 vPFK &= 1.1 \times 10^{-7} \times \frac{822 \times ATP[t] \times f6p[t]}{6.8 \times 10^{-5} \times 2.7 \times 10^{-4}} - \frac{36 \times fdp[t] \times ADP[t]}{4.2 \times 10^{-4} \times 5.4 \times 10^{-4}} \\
 &+ \frac{ATP[t]}{6.8 \times 10^{-5}} + \frac{f6p[t]}{2.7 \times 10^{-4}} + \frac{ATP[t] \times f6p[t]}{6.8 \times 10^{-5} \times 2.7 \times 10^{-4}} + \frac{fdp[t]}{4.2 \times 10^{-4}} + \frac{ADP[t]}{5.4 \times 10^{-4}} + \frac{fdp[t] \times ADP[t]}{4.2 \times 10^{-4} \times 5.4 \times 10^{-4}} ; \\
 vALD &= \frac{b23pg}{1 + \frac{b23pg}{0.0015} + \frac{fdp[t]}{1.65 \times 10^{-5}} + \frac{3.5 \times 10^{-5} \times ga3p[t]}{1.9 \times 10^{-4} \times 1.1 \times 10^{-5}} + \frac{dhap[t]}{1.1 \times 10^{-5}} + \frac{1.98 \times 10^{-5} \times 1.1 \times 10^{-5} \times 1.9 \times 10^{-4}}{7.95 \times p3g[t]} + \frac{3.5 \times 10^{-5} \times fdp[t] \times ga3p[t]}{1.1 \times 10^{-5} \times 1.9 \times 10^{-4}} ; \\
 &+ \frac{1280 \times dhap[t]}{1.62 \times 10^{-4}} - \frac{14560 \times ga3p[t]}{4.46 \times 10^{-4}} ; \quad vPGM = 4.1 \times 10^{-7} \times \frac{1.68 \times 10^{-4}}{4.6 \times 10^{-5}} + \frac{p2g[t]}{4.6 \times 10^{-5}} ; \quad vEN = 2.2 \times 10^{-7} \times \frac{190 \times p2g[t]}{1.4 \times 10^{-4}} - \frac{50 \times pep[t]}{3.1 \times 10^{-4}} \\
 &+ \frac{1}{1 + \frac{dhap[t]}{1.62 \times 10^{-4}} + \frac{ga3p[t]}{4.46 \times 10^{-4}}} ; \quad vGAPDH = 7.66 \times 10^{-6} \times \frac{232 \times NAD[t] \times ga3p[t]}{4.5 \times 10^{-5} \times 0.065} - \frac{2765 \times b13pg[t] \times NADH[t]}{10^{-5} \times 3.3 \times 10^{-6}} ; \\
 &+ \frac{ga3p[t]}{3.1 \times 10^{-5}} + \left( \frac{b13pg[t]}{10^{-5}} \right) \times \left( 1 + \frac{ga3p[t]}{3.1 \times 10^{-5}} \right) + \frac{6.7 \times 10^{-7} \times NADH[t]}{10^{-5} \times 3.3 \times 10^{-6}} + \frac{9.5 \times 10^{-5} \times NAD[t]}{4.5 \times 10^{-5} \times 0.00316} + \frac{NAD[t] \times ga3p[t]}{4.5 \times 10^{-5} \times 0.065} + \\
 &+ \left( \frac{ga3p[t]}{0.065} \right) \times \left( 1 + \frac{ga3p[t]}{3.1 \times 10^{-5}} \right) + \frac{NAD[t] \times b13pg[t]}{4.5 \times 10^{-5} \times 10^{-5}} + \frac{6.7 \times 10^{-7} \times NADH[t]}{10^{-5} \times 3.3 \times 10^{-6}} + \frac{ga3p[t] \times NADH[t]}{0.065 \times 10^{-5}} \\
 vPGK &= 2.74 \times 10^{-6} \times \frac{2290 \times b13pg[t] \times ADP[t]}{2 \times 10^{-6} \times 8 \times 10^{-5}} - \frac{917 \times p3g[t] \times ATP[t]}{0.0011 \times 1.3 \times 10^{-4}} ; \\
 &+ \frac{b13pg[t]}{1.6 \times 10^{-6}} + \frac{ADP[t]}{8 \times 10^{-5}} + \frac{b13pg[t] \times ADP[t]}{8 \times 10^{-5} \times 2 \times 10^{-6}} + \frac{p3g[t]}{2.05 \times 10^{-4}} + \frac{ATP[t]}{1.3 \times 10^{-4}} + \frac{p3g[t] \times ATP[t]}{1.3 \times 10^{-4} \times 0.0011} \\
 vPK &= 8.7 \times 10^{-8} \times \frac{1386 \times ADP[t] \times pep[t]}{4.74 \times 10^{-4} \times 2.25 \times 10^{-4}} - \frac{3.26 \times pyr[t] \times ATP[t]}{0.002 \times 0.003} ; \\
 &+ \frac{ADP[t]}{4.74 \times 10^{-4}} + \frac{pep[t]}{2.25 \times 10^{-4}} + \frac{ADP[t] \times pep[t]}{4.74 \times 10^{-4} \times 2.25 \times 10^{-4}} + \frac{pyr[t]}{0.002} + \frac{ATP[t]}{0.003} + \frac{pyr[t] \times ATP[t]}{0.002 \times 0.003} ; \\
 vEN &= \frac{3.43 \times 10^{-6} \times \left( \frac{458 \times NADH[t] \times pyr[t]}{2.45 \times 10^{-6} \times 1.37 \times 10^{-4}} - \frac{115 \times NAD[t] \times lac[t]}{0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}} \right)}{8.44 \times 10^{-6} \times pyr[t]} + \frac{0.00107 \times NAD[t]}{0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}} * \left( 1 + \frac{pyr[t]}{1.01 \times 10^{-4}} + \frac{NADH[t] \times lac[t]}{2.45 \times 10^{-6} + 0.00733} + \frac{NADH[t] \times pyr[t]}{2.45 \times 10^{-6} \times 1.37 \times 10^{-4}} + \frac{0.00107 \times NADH[t] \times NAD[t]}{2.45 \times 10^{-6} \times 0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}} + \right. \\
 &\left. + \frac{8.44 \times 10^{-6} \times pyr[t]}{2.45 \times 10^{-6} \times 1.37 \times 10^{-4}} + \frac{0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}}{2.45 \times 10^{-6} + 0.00733} + \frac{2.45 \times 10^{-6} \times 1.37 \times 10^{-4}}{2.45 \times 10^{-6} \times 0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}} + \frac{2.45 \times 10^{-6} \times 0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}}{2.45 \times 10^{-6} \times 0.00733 \times 1.07 \times 10^{-4}} \right) \\
 &+ \frac{8.44 \times 10^{-6} \times pyr[t] \times lac[t]}{2.45 \times 10^{-6} \times 1.37 \times 10^{-4} \times 0.00733} \\
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\mathbf{vG6PDDH} &= 6.4 \times 10^{-5} \times \frac{\text{NADP}[t] \times \text{g6p}[t]}{3.67 \times 10^{-6} \times 6.67 \times 10^{-5} + \frac{\text{NADPH}[t]}{\text{g6p}[t]} + 3.12 \times 10^{-6}}; \quad \mathbf{v6PGlase} = \frac{6.26 \times 10^{-4} \times \text{gl6p}[t]}{7.99 \times 10^{-5} + \text{gl6p}[t]}; \\
\mathbf{k1} &= 2400000; \mathbf{k2} = 410; \mathbf{k3} = 2 \times 10^9; \mathbf{k4} = 260000; \mathbf{k5} = 48; \mathbf{k6} = 30; \mathbf{k7} = 630; \mathbf{k8} = 360000; \mathbf{k9} = 800; \mathbf{k10} = 2250000; \mathbf{k11} = 300; \mathbf{k12} = 4950000; \mathbf{N1} \\
&= \mathbf{k1k3k5k7k9}; \mathbf{N2} = \mathbf{k2k4k6k8k10}; \mathbf{D1} = \mathbf{k2k9(k4k6 + k5k6 + k5k7)}; \mathbf{D2} = \mathbf{k1k9(k4k6 + k5k6 + k5k7)}; \mathbf{D3} = \mathbf{k3k5k7k9}; \mathbf{D4} := \mathbf{k2k4k6k8}; \mathbf{D5} \\
&= \mathbf{k2k10(k4k6 + k5k6 + k5k7)}; \mathbf{D6} = \mathbf{k1k3(k5k7 + k5k9 + k6k9 + k7k9)}; \mathbf{D7} = \mathbf{k1k4k6k8}; \mathbf{D8} = \mathbf{k3k5k7k10}; \mathbf{D9} \\
&= \mathbf{k8k10(k2k4 + k2k5 + k2k6 + k4k6)}; \mathbf{D10} = \mathbf{k1k3k8(k5 + k6)}; \mathbf{D11} = \mathbf{k3k8k10(k5 + k6)}; \\
\mathbf{v6PGDDH} &= \frac{2.1 \times 10^{-6} \times (\mathbf{N1} \times \text{NADP}[t] \times \text{go6p}[t] - \mathbf{N2} \times \text{ru5p}[t] \times \text{NADPH}[t])}{\mathbf{D1} + \mathbf{D2} \times \text{NADP}[t] + \mathbf{D3} \times \text{go6p}[t] + \mathbf{D4} \times \text{ru5p}[t] + \mathbf{D5} \times \text{NADPH}[t] + \mathbf{D6} \times \text{NADP}[t] \times \text{go6p}[t] + \mathbf{D7} \times \text{NADP}[t] \times \text{ru5p}[t] + \mathbf{D8} \times \text{go6p}[t] \times \text{NADPH}[t] + \mathbf{D9} \times \text{ru5p}[t] \times \text{NADPH}[t] +} \\
&+ \mathbf{D10} \times \text{NADP}[t] \times \text{go6p}[t] \times \text{ru5p}[t] + \mathbf{D11} \times \text{go6p}[t] \times \text{ru5p}[t] \times \text{NADPH}[t]} \\
&\frac{14.2 \times \text{ru5p}[t]}{33.3 + 14.2} - \frac{33.3 \times \text{r5p}[t]}{60900} - \frac{33.3 \times \text{r5p}[t]}{33.3 + 14.2} \\
\mathbf{vRSPI} &= 1.42 \times 10^{-5} \times \frac{\text{ru5p}[t]}{1 + \frac{\text{ru5p}[t]}{33.3 + 14.2} + \frac{\text{r5p}[t]}{60900}}; \quad \mathbf{vX5PI} = 4.22 \times 10^{-6} \times \frac{\text{ru5p}[t]}{1 + \frac{\text{ru5p}[t]}{438 + 305} + \frac{\text{x5p}[t]}{3910000}}; \\
\mathbf{k1} &= 21600; \mathbf{k2} = 45.3; \mathbf{k3} = 16.3; \mathbf{k4} = 30000; \mathbf{k5} = 490000; \mathbf{k6} = 60; \mathbf{k7} := 17; \mathbf{k8} = 79000; \mathbf{M11} = \mathbf{k1k3k5 * k7}; \mathbf{M12} = \mathbf{k2k4k6k8}; \mathbf{T11} = \mathbf{k1k3(k6 + k7)}; \mathbf{T12} \\
&= \mathbf{k5k7(k2 + k3)}; \mathbf{T13} = \mathbf{k2k4(k6 + k7)}; \mathbf{T14} = \mathbf{k6k8(k2 + k3)}; \mathbf{T15} = \mathbf{k1k5(k3 + k7)}; \mathbf{T16} = \mathbf{k4k8(k2 + k6)}; \mathbf{T17} = \mathbf{k5k8(k2 + k3)}; \mathbf{T18} \\
&= \mathbf{k1k4(k6 + k7)}; \\
\mathbf{vTA} &= 6.9 \times 10^{-7} \times \frac{\mathbf{M11} \times \text{s7p}[t] \times \text{ga3p}[t] - \mathbf{M12} \times \text{e4p}[t] \times \text{f6p}[t]}{\mathbf{T11} \times \text{s7p}[t] + \mathbf{T12} \times \text{ga3p}[t] + \mathbf{T13} \times \text{e4p}[t] + \mathbf{T14} \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T15} \times \text{s7p}[t] \times \text{ga3p}[t] + \mathbf{T16} \times \text{e4p}[t] \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T17} \times \text{ga3p}[t] \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T18} \times \text{s7p}[t] \times \text{e4p}[t]}; \\
\mathbf{k1} &= 216000; \mathbf{k2} = 38; \mathbf{k3} = 34; \mathbf{k4} = 156000; \mathbf{k5} = 329000; \mathbf{k6} = 175; \mathbf{k7} = 40; \mathbf{k8} = 44800; \mathbf{M21} = \mathbf{k1k3k5k7}; \mathbf{M22} = \mathbf{k2k4k6k8}; \mathbf{T21} = \mathbf{k1k3(k6 + k7)}; \mathbf{T22} \\
&= \mathbf{k5k7(k2 + k3)}; \mathbf{T23} = \mathbf{k2k4(k6 + k7)}; \mathbf{T24} = \mathbf{k6k8(k2 + k3)}; \mathbf{T25} = \mathbf{k1k5(k3 + k7)}; \mathbf{T26} = \mathbf{k4k8(k2 + k6)}; \mathbf{T27} = \mathbf{k5k8(k2 + k3)}; \mathbf{T28} \\
&= \mathbf{k1k4(k6 + k7)}; \\
\mathbf{vTK1} &= 3.3 \times 10^{-7} \times \frac{\mathbf{M21} \times \text{x5p}[t] \times \text{r5p}[t] - \mathbf{M22} \times \text{ga3p}[t] \times \text{s7p}[t]}{\mathbf{T21} \times \text{x5p}[t] + \mathbf{T22} \times \text{r5p}[t] + \mathbf{T23} \times \text{ga3p}[t] + \mathbf{T24} \times \text{s7p}[t] + \mathbf{T25} \times \text{x5p}[t] \times \text{r5p}[t] + \mathbf{T26} \times \text{ga3p}[t] \times \text{s7p}[t] + \mathbf{T27} \times \text{r5p}[t] \times \text{s7p}[t] + \mathbf{T28} \times \text{x5p}[t] \times \text{ga3p}[t]} \\
\mathbf{k1} &= 216000; \mathbf{k2} = 38; \mathbf{k3} = 34; \mathbf{k4} = 156000; \mathbf{k5} = 2240000; \mathbf{k6} = 175; \mathbf{k7} = 40; \mathbf{k8} = 213000; \mathbf{M31} = \mathbf{k1k3k5k7}; \mathbf{M32} = \mathbf{k2k4k6k8}; \mathbf{T31} = \mathbf{k1k3(k6 + k7)}; \mathbf{T32} \\
&= \mathbf{k5k7(k2 + k3)}; \mathbf{T33} = \mathbf{k2k4(k6 + k7)}; \mathbf{T34} = \mathbf{k6k8(k2 + k3)}; \mathbf{T35} = \mathbf{k1k5(k3 + k7)}; \mathbf{T36} = \mathbf{k4k8(k2 + k6)}; \mathbf{T37} = \mathbf{k5k8(k2 + k3)}; \mathbf{T38} \\
&= \mathbf{k1k4(k6 + k7)}; \\
\mathbf{vTK2} &= 3.3 \times 10^{-7} \times \frac{\mathbf{M31} \times \text{x5p}[t] \times \text{e4p}[t] - \mathbf{M32} \times \text{ga3p}[t] \times \text{f6p}[t]}{\mathbf{T31} \times \text{x5p}[t] + \mathbf{T32} \times \text{e4p}[t] + \mathbf{T33} \times \text{ga3p}[t] + \mathbf{T34} \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T35} \times \text{x5p}[t] \times \text{e4p}[t] + \mathbf{T36} \times \text{ga3p}[t] \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T37} \times \text{e4p}[t] \times \text{f6p}[t] + \mathbf{T38} \times \text{x5p}[t] \times \text{ga3p}[t]}
\end{aligned}$$

## Regulation of the Structural Stability of Erythrocytes by Hydrogen Peroxide: Mathematical Model and Experiment

V. V. Voinarouski<sup>1</sup>, \*, G. G. Martinovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

\*e-mail: voynarovskiy@bsu.by

In this work, using a mathematical model that takes into account the key stages of the formation of methemoglobin and ferrylhemoglobin and their binding to the erythrocyte membrane, we analyze the regulatory mechanisms induced by extracellular hydrogen peroxide. The results of numerical modeling showed that the reversible binding of methemoglobin to the membrane is an adaptive mechanism aimed at stabilizing the lipid bilayer of the membrane. On the other hand, an increase in the concentration of ferrylhemoglobin and its binding to the membrane leads to an increase in pathophysiological processes that reduce the structural stability of cells. The amount of formed methemoglobin and ferrylhemoglobin depends on the concentration of extracellular hydrogen peroxide and the incubation time, the number of cells in solution, the state of the antioxidant system of erythrocytes, the metabolic activity of cells, and external metabolic conditions. On the basis of the numerical modeling, the optimal conditions (concentration of the oxidant, incubation time), under which the activation of adaptation processes is observed, are established. In the *in vitro* experiments it was shown that in the presence of 10–200  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide, structural stability of the erythrocyte membrane increases and the proportion of hemolyzed erythrocytes decreases.

**Keywords:** erythrocytes, hydrogen peroxide, methemoglobin, adaptation, hormesis

УДК 547.461.4:616.831-002:612.013.1:599.323.4

## ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТ ИНДУЦИРУЕТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ ПОЛЯРИЗАЦИЮ МИКРОГЛИИ В МОЗГЕ СТАРЕЮЩИХ КРЫС

© 2022 г. Ю. И. Кирова<sup>а</sup>, \*, Ф. М. Шакова<sup>а</sup>, Т. А. Воронина<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>б</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, 125315 Россия

\*e-mail: bioenerg@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021 г.

После доработки 06.06.2021 г.

Принята к публикации 07.06.2021 г.

Сукцинатный рецептор SUCNR1 (GPR91) конститутивно экспрессируется главными популяциями иммунных клеток. Сукцинат, как иммунометаболит (метабокин), осуществляет SUCNR1-зависимую модуляцию морфофункционального состояния иммунных клеток и является важным регулятором врожденного, адаптивного иммунитета и тканевого гомеостаза. Противоречивые интерпретации роли сукцинатной сигнализации в функционировании макрофагов, отсутствие исследований влияния SUCNR1 на морфофункциональную трансформацию микроглии, проблема низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для любых перспективных аналогов сукцината предопределили проведение настоящего исследования. Цель работы заключалась в оценке влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на поляризацию микроглии при хроническом воспалении в стареющем мозге. Работа была выполнена на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 3 (молодые), 6 (средневозрастные) и 18 месяцев (старые). В качестве формы сукцината, преодолевающей ГЭБ, был использован препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат). Мексидол вводили внутривенно в дозе 100 мг/кг ежедневно на протяжении 3, 7, 14 дней. В образцах коры головного мозга методом иммуноблоттинга выявляли поверхностные маркеры про- (M1) и противовоспалительного (M2) фенотипа микроглии (CD86 и CD206 соответственно), цитоплазматический маркер микроглии Iba1, а также провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  (экспрессируются M1-микроглией), иммуносупрессорный цитокин TGF- $\beta$ 1 и нейротрофин BDNF (экспрессируются M2-микроглией). Было показано, что экспрессия клеточных маркеров про- (CD86) и особенно противовоспалительной микроглии (CD206), снижается у старых крыс, однако уровень маркера Iba1, экспрессируемого независимо от фенотипа, остается неизменным во всех исследованных группах, что указывает на поддержание количественно равноценных популяций микроглии в разновозрастных группах. При этом уровень TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  увеличивался, а содержание TGF- $\beta$ 1 и BDNF было значимо ниже у старых крыс в сравнении с молодыми и средневозрастными. В целом полученные данные свидетельствуют о доминировании провоспалительного статуса микроглии в стареющем мозге. 14-дневный курс мексидола вызывал слабое снижение уровня CD86 у старых крыс и значимое увеличение на 45% содержания CD206 до уровня CD206 у 6-месячных крыс. Увеличение экспрессии CD206 происходило сопряженно с увеличением уровня TGF- $\beta$ 1 и BDNF на 60% и 35% соответственно, что свидетельствует о вовлечении сукцинат/SUCNR1-сигнализации в противовоспалительную поляризацию микроглии в стареющем мозге. Полученные данные развивают представления о церебральных эффектах сукцинат/SUCNR1-сигнализации и раскрывают новый компонент механизма нейропротекторного действия мексидола.

**Ключевые слова:** этилметилгидроксипиридина сукцинат, SUCNR1, микроглия, нейровоспаление, старение, крысы

**DOI:** 10.31857/S0233475521060049

### ВВЕДЕНИЕ

Сукцинатный рецептор SUCNR1 (GPR91, G-protein coupled receptor 91), открытый в 2004 г., экспрессируется в различных типах клеток орга-

низма и служит системой детекции экстремальных состояний (локального стресса), таких как ишемия, гипоксия, повреждение тканей, воспаление [1]. Лиганд рецептора янтарная кислота –

интермедиат цикла трикарбонных кислот (ЦТК) — в условиях физиологического покоя обнаруживается в крови и внеклеточной среде в низких концентрациях (2–20 мкМ) [2]. При гипоксии/ишемии продукция янтарной кислоты экспоненциально увеличивается в восстановительном (обратном) цикле Кребса в результате фумарат-редуктазной активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), что позволяет рассматривать сукцинат как сигнал опасности (алармин), инициирующий через активацию сукцинатного рецептора SUCNR1 адаптивные механизмы, направленные на снижение кислородного/энергетического дефицита, включая вазодилатацию, ангиогенез, пролиферацию эритроидных прогениторных клеток, повышение артериального давления, стимуляцию сердечной деятельности [3, 4].

Исследования минувшего пятилетия раскрыли иммуномодулирующую роль янтарной кислоты. Было показано, что сукцинатный рецептор конститутивно экспрессируется главными популяциями иммунцитов (лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки), а сигнальная система сукцинат/SUCNR1 является важным регулятором врожденного [5], адаптивного иммунитета [6] и тканевого гомеостаза [7].

Одним из нерешенных вопросов текущего этапа изучения иммуномодулирующей активности янтарной кислоты остается ее роль в воспалительной реакции. Некоторые исследования продемонстрировали провоспалительную природу сукцината и его участие в развитии хронического нерегулируемого воспаления. Согласно этому представлению провоспалительные стимулы инициируют производство и высвобождение сукцината из цитотоксических (воспалительных) макрофагов, после чего внеклеточный сукцинат стимулирует в SUCNR1-экспрессирующих мононуклеарных фагоцитах продукцию IL-1 $\beta$ , поддерживая хроническое воспалительное состояние через аутокринный и паракринный механизмы [8, 9]. Однако недавние исследования подтвердили ключевую роль оси сукцинат/SUCNR1 в активации противовоспалительных механизмов. Было показано, что SUCNR1<sup>-/-</sup> макрофаги демонстрируют более выраженную провоспалительную поляризацию (M1-фенотип) в сравнении с контролем в ответ на стимуляцию липополисахаридом [10], SUCNR1-экспрессирующие нервные стволовые клетки под действием внеклеточного сукцината оказывают противовоспалительные эффекты [11], активация SUCNR1 макрофагов мышей индуцирует преобладающий противовоспалительный M2-фенотип [12].

В настоящее время внеклеточный сукцинат определяют как метаболит (иммунометаболит), способный оказывать рецептор-опосредованное влияние на метаболизм, морфологию и функции

иммунных клеток [13]. В целом накопленные данные свидетельствуют о том, что сукцинат, производимый и высвобождаемый провоспалительными макрофагами, может активировать SUCNR1 на мононуклеарных фагоцитах и формировать как провоспалительные, так и противовоспалительные фенотипы [10]. Противоречивые интерпретации роли сукцинатной сигнализации в функционировании макрофагов, отсутствие исследований влияния SUCNR1 на морфофункциональную трансформацию резидентных макрофагов (микроглия) центральной нервной системы (ЦНС), проблема низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для любых перспективных аналогов сукцината [10] предопределили проведение настоящего исследования.

В работе в качестве формы сукцината, способной преодолевать ГЭБ, был использован отечественный препарат мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат), который в настоящее время широко применяется в клинической и амбулаторной практике для лечения различных заболеваний, связанных с синдромами ишемии и гипоксии различного генеза, в том числе патологией мозга и сердечно-сосудистой системы, включая инсульты и возрастные нейродегенеративные болезни. Широкий спектр эффектов мексидола (энерготропный, антигипоксический, антиоксидантный) определяется его базисным политаргетным механизмом действия и мультимодальными свойствами, реализуемыми SUCNR1-опосредованно и SUCNR1-независимо [14–16]. Мексидол гидролизует до сукцинат-аниона и этилметилгидроксипиридинового (ЭМГП) катиона, преодолевает ГЭБ, достигает наибольшего содержания в коре головного мозга, выявляется в цитозольной и митохондриальной фракциях, окисляется в митохондриях, реализуя антигипоксическое действие. Пиридиновый цикл ЭМГП облегчает транспорт сукцината через мембраны, повышает проницаемость ГЭБ для мексидола, оказывает антиоксидантное действие [17, 18]. Мексидол улучшает энергетический статус клетки [19], повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, снижает активность индуцибельной NO-синтазы [16], уменьшает глутаматную эксайтотоксичность [20]. Установлено, что мексидол оптимизирует процессы обучения и памяти, нарушенные у старых мышей, улучшая как обучение, так и хранение и воспроизведение информации, и увеличивает продолжительность жизни животных [21, 22].

Ранее нами было показано [23], что курсовое введение мексидола аутобредным крысам-самцам молодого и старческого возраста сопровождается дозозависимой индукцией в коре головного мозга (КГМ) животных сукцинатного рецептора SUCNR1 и белков-маркеров биогенеза митохондрий: транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ ,

транскрипционных факторов NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательных ферментов (NDUFB2, SDHA, cyt b, COX2) и АТФ-синтазы (АТФ5А). Полученные данные свидетельствуют о способности мексидола индуцировать церебральный митохондриогенез и устранять митохондриальную дисфункцию у молодых и старых животных и, таким образом, оказывать влияние на одно из ключевых патогенетических звеньев развития нарушений при старении и нейродегенеративных заболеваниях. В развитии сукцинат/SUCNR1-зависимой индукции митохондриальных ферментов в КГМ нельзя исключать потенцирующие эффекты других сигнальных систем, в частности, SUCNR1-опосредованное формирование нейропротекторного репаративного фенотипа микроглии (M2-поляризация) и M2-зависимую секрецию ростовых и нейротрофических факторов, активирующих митохондриогенез [7].

Противовоспалительные эффекты мексидола в аспекте регуляторного влияния сигнальной системы сукцинат/SUCNR1 на иммунные и воспалительные реакции ранее не исследовались.

Цель работы заключалась в оценке влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на поляризацию микроглии при хроническом воспалении в стареющем мозге.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 3, 6 и 18 месяцев (молодые, средневозрастные, старые крысы;  $n = 90$ ), выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов были утверждены этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП».

Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) использовали в инъекционной форме (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», 50 мг/мл) для внутрибрюшинного (в/б) введения в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 3, 7, 14 дней. Для каждого анализируемого периода курса (3, 7, 14-й день) и для каждого возраста (3, 6, 18 месяцев) были сформированы группы контроля (курс ежедневных в/б инъекций изотонического раствора (NaCl 0.9%) в соответствии со схемой введения мексидола; 9 групп, в каждой  $n = 4$ ) и опытные группы (9 групп, в каждой  $n = 6$ ). Забой

животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом через сутки после заключительной инъекции. Непосредственно после декапитации КГМ отделяли на льду, замораживали и хранили в жидком азоте.

В лизатах КГМ методом иммуноблотинга выявляли поверхностные маркеры про- (M1) и противовоспалительного (M2) фенотипа микроглии (CD86, T-lymphocyte activation antigen; CD206, macrophage mannose receptor 1 соответственно), цитоплазматический маркер микроглии/макрофагов Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), а также провоспалительные интерлейкины TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) и IL-1 $\beta$  (interleukin 1 beta) (экспрессируются M1-микроглией), иммуносупрессорный цитокин TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta) и нейротрофин BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (экспрессируются M2-микроглией) [24].

Замороженные образцы КГМ растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния. Навески массой 100 мг лизировали на льду в течение 30 мин в охлажденном до 2°C лизис-буфере (в соотношении 1V ткань : 6V буфер; 50 мМ HEPES, pH 7.6, 150 мМ NaCl, 2 мМ EGTA, 1% тритон X-100, 10% глицерин, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ AEBSF, 60 мкг/мл апроитинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А) (Sigma-Aldrich, США) [25]. После центрифугирования (30 мин, 14000 g, 4°C) супернатант (лизат КГМ без ядерной фракции), содержащий искомые белки, смешивали с загрузочным буфером (4x Laemmli Sample Buffer), инкубировали 5 мин при 95°C и хранили при -80°C. Концентрацию общего белка в пробах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Белки лизата КГМ разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроолюцией. Мембрану инкубировали с первичными моноклональными антителами (разведение 1 : 500, 14 ч, 4°C; Santa Cruz Biotechnology Inc., США) против CD86 (sc-28347), CD206 (sc-58986), Iba1 (sc-32725), BDNF (sc-65514), SDHA (sc-166909); первичными поликлональными антителами (разведение 1 : 500, 14 ч, 4°C; Santa Cruz Biotechnology Inc., США; Abcam plc, Великобритания) против IL-1 $\beta$  (sc-1252), TNF- $\alpha$  (sc-1349), TGF- $\beta$ 1 (ab-92486), SUCNR1/GPR91 (ab-41505); вторичными антителами (разведение 1 : 5000, 1 ч, 4°C), конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-mouse sc-516102, anti-goat sc-2768, anti-rabbit ab-205718). В качестве контроля использовали антитела к актину (sc-376421). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, США). О содержании искомых белков судили по плотности окрашивания полосы связывания ан-

тител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с использованием непараметрического рангового *U*-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании была выполнена оценка уровня экспрессии белков-маркеров провоспалительного (цитотоксического) М1-фенотипа микроглии и противовоспалительного (регенеративного) М2-фенотипа. М1-трансформация микроглии развивается в ответ на воздействие бактериальных и вирусных агентов, молекул паттерна клеточного повреждения (damage-associated molecular pattern, DAMP), интерферонов, гипоксии/ишемии и характеризуется округлой формой, утолщенными короткими отростками, высокой пролиферативной и миграционной активностью, продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, матриксных металлопротеиназ, цитотоксичных активных форм кислорода и азота. М1-микроглия выполняет микробцидную, антигенпредставляющую, иммуностимулирующую функции [24, 26, 27]. М2-микроглия формируется в ответ на воздействие глюкокортикоидов, противовоспалительных цитокинов, некоторых метаболитов (аденозин), характеризуется крупными размерами, амебоидной формой, высокой фагоцитарной активностью, секрецией ростовых факторов, противовоспалительных цитокинов, нейротрофинов. М2-микроглия подавляет воспалительную реакцию, активирует механизмы репарации/регенерации [24, 26, 27]. Концепция полярных состояний (М1/М2) микроглии (макрофагов) подверглась в последние годы существенному пересмотру. Согласно текущим представлениям в условиях *in vivo* мононуклеарные фагоциты представлены в виде промежуточных (смешанных) состояний активации, образующих широкий вариативный спектр между крайними фенотипами полярности М1/М2 и обеспечивающих высокоэффективную координацию воспалительных/ре-

паративных ответов в зависимости от изменения условий и стимулов [27, 28].

Оценка базового уровня экспрессии поверхностных маркеров, специфически продуцируемых провоспалительным (CD86) и противовоспалительным (CD206) фенотипом микроглии, показала, что содержание CD86 в КГМ снижалось у старых крыс на 20% в сравнении с 3- и 6-месячными крысами, в то время как содержание CD206 прогрессивно снижалось с увеличением возраста животных: на 25% в группе 6-месячных крыс и на 55% в группе старых крыс в сравнении с молодыми 3-месячными крысами (рис. 1а, 1б, 2а, 2б). Снижение экспрессии поверхностных рецепторов является типичной особенностью стареющей (дистрофической) микроглии, также как уменьшение размеров микроглиоцитов, количества отростков и их разветвлений [29].

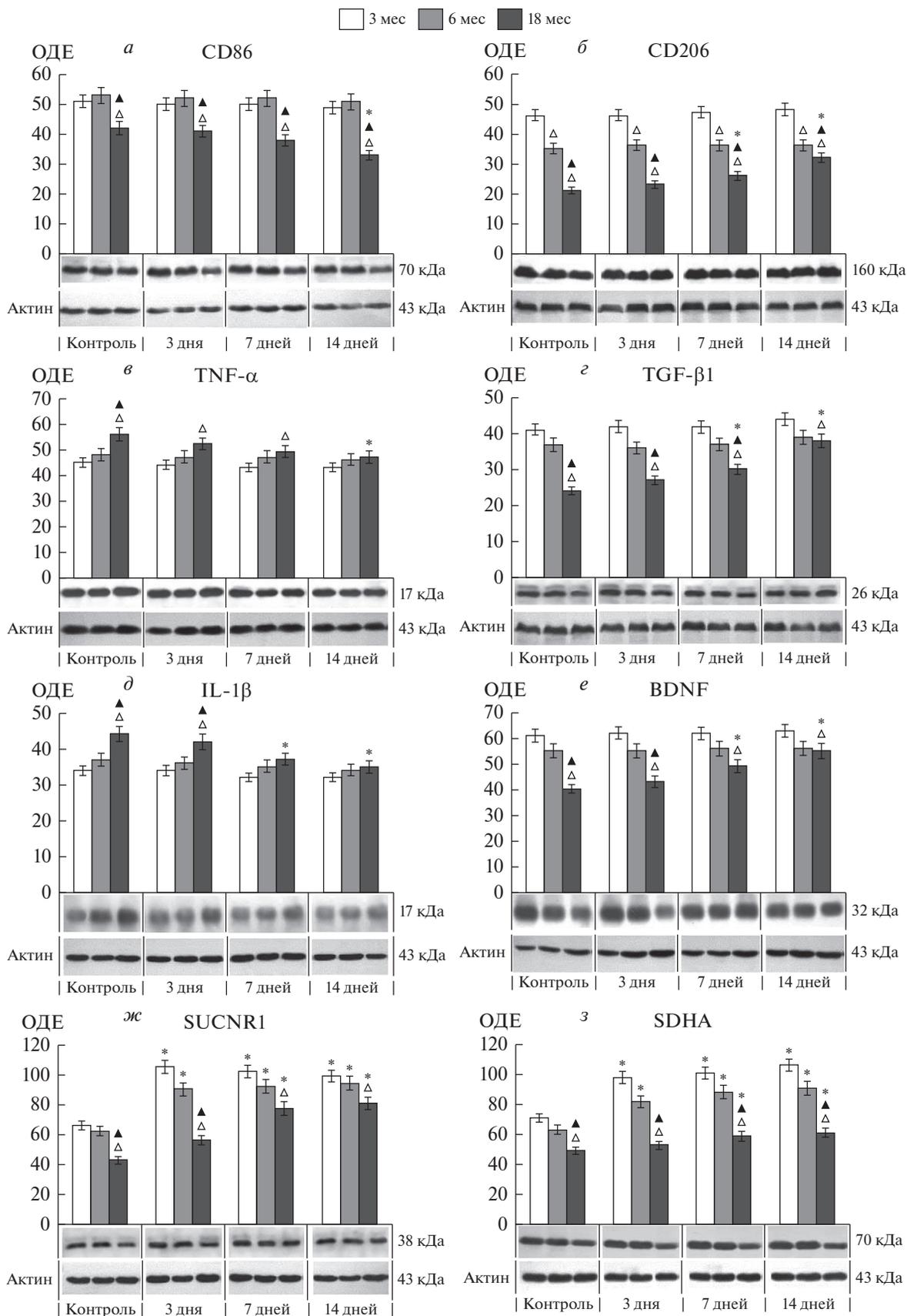
Несмотря на возрастзависимое снижение уровня поверхностных маркеров про- и, особенно, противовоспалительного фенотипов микроглии, содержание цитоплазматического микроглиального маркера Iba1, экспрессируемого независимо от фенотипа, оставалось неизменным во всех исследованных группах (рис. 2и), что косвенно указывает на поддержание количественно равноценных популяций микроглии в разновозрастных группах.

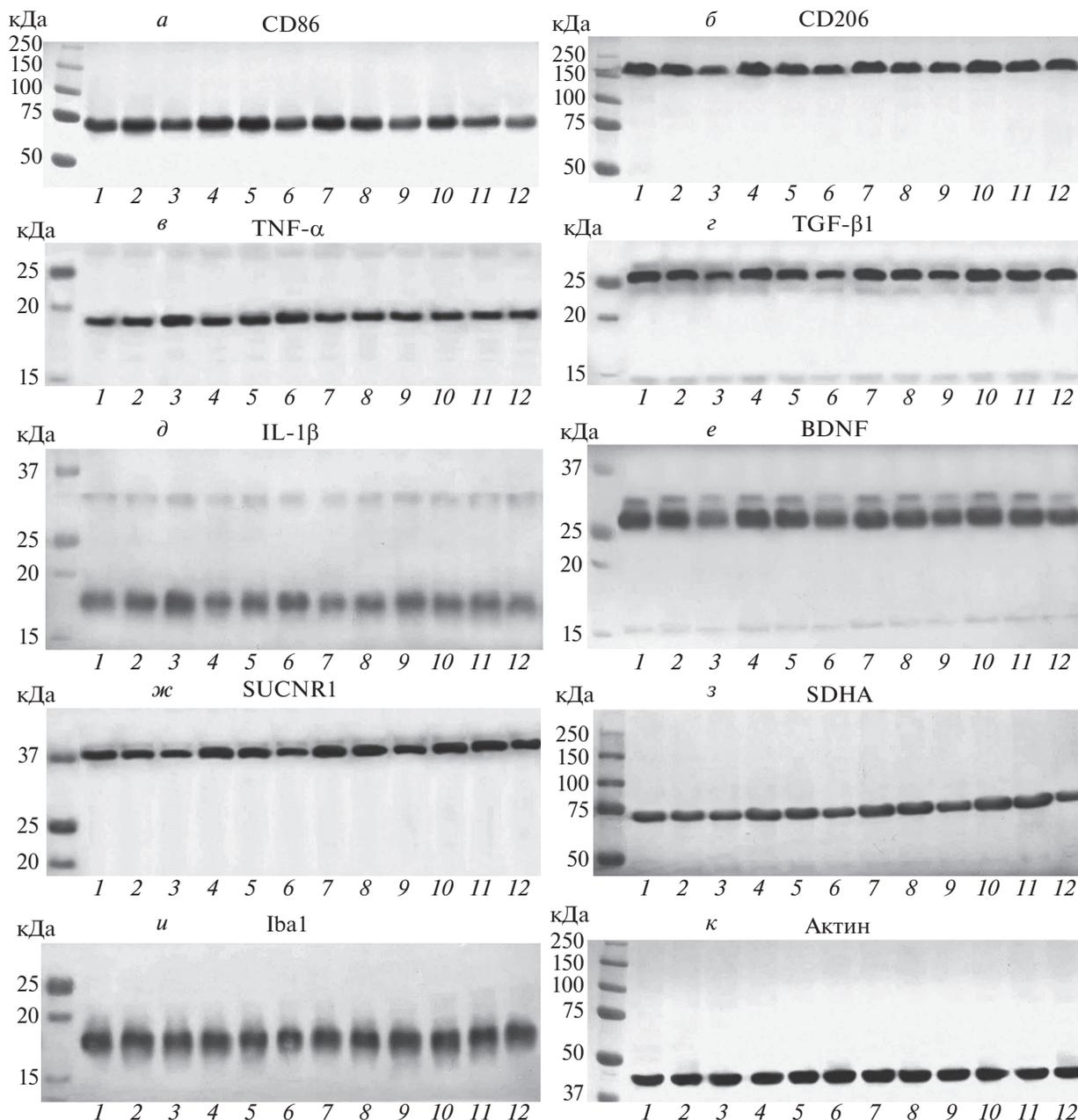
Содержание провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в КГМ увеличивалось на 20% в группе старых животных в сравнении с молодыми и средневозрастными (рис. 1в, 1д, 2в, 2д). Уровень экспрессии BDNF снижался на 30%, а TGF- $\beta$ 1 – на 40% у 18-месячных крыс в сравнении с молодыми и средневозрастными (рис. 1з, 1е, 2з, 2е).

В целом выявленное значительное снижение содержания маркеров противовоспалительной полярности микроглии у старых крыс свидетельствует о доминировании провоспалительного статуса микроглии в стареющем мозге. Факт провоспалительной трансформации стареющей микроглии хорошо известен и, предположительно, связан с накоплением повреждений ДНК в долгоживущих микроглиоцитах нервной ткани [29].

Курсовое введение мексидола (100 мг/кг, в/б, 14 дней, ежедневно) сопровождалось слабым снижением (на 15%) уровня экспрессии CD86 и

**Рис. 1.** Динамика экспрессии поверхностных маркеров провоспалительного (CD86, а) и противовоспалительного/регенеративного (CD206, б) фенотипа микроглии, воспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , в; IL-1 $\beta$ , д), трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ 1, з), нейротрофического фактора мозга (BDNF, е), сукцинатного рецептора (SUCNR1, ж) и каталитической субъединицы сукцинатдегидрогеназы (SDHA, з) в коре головного мозга крыс в возрасте 3, 6 и 18 месяцев на протяжении 14-дневного курса мексидола (100 мг/кг; в/б; ежедневные инъекции). Показаны результаты денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы.  $\Delta$  – данные отличаются от группы молодых (3-месячных) крыс ( $p < 0.01$ ) в соответствующем временном периоде;  $\blacktriangle$  – данные отличаются от группы средневозрастных (6-месячных) крыс ( $p < 0.01$ ) в соответствующем временном периоде; \* – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ( $p < 0.01$ ). CD86 – T-lymphocyte activation antigen, CD206 – macrophage mannose receptor 1, TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor alpha, TGF- $\beta$ 1 – transforming growth factor beta 1, IL-1 $\beta$  – interleukin 1 beta, BDNF – brain-derived neurotrophic factor, SUCNR1 – succinate receptor 1, SDHA – succinate dehydrogenase subunit A.





**Рис. 2.** Фотографии Rg-пленок, совмещенных с нитроцеллюлозной мембраной (предокрашенный маркер молекулярных масс белков, кДа), демонстрируют результаты хемолюминесцентной детекции белков-маркеров микроглиальных фенотипов в коре головного мозга крыс в возрасте 3, 6 и 18 месяцев на протяжении 14-дневного курса мексидола (100 мг/кг; в/б; ежедневные инъекции). Показаны репрезентативные иммуноблоты лизатов КГМ молодых (1, 4, 7, 10), средневозрастных (2, 5, 8, 11) и старых (3, 6, 9, 12) крыс в контроле и через 3, 7, 14 дней введения мексидола соответственно. Поверхностные маркеры провоспалительного (CD86, а) и противовоспалительного/регенеративного (CD206, б) фенотипа микроглии, воспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , в; IL-1 $\beta$ , д), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1, г), нейротрофический фактор мозга (BDNF, е), сукцинатный рецептор (SUCNR1, ж), каталитическая субъединица сукцинатдегидрогеназы (SDHA, з), цитоплазматический маркер микроглии (Iba1, и), актин (к).

значимым увеличением (на 45%) уровня CD206 в КГМ старых животных, который достигал содержания CD206 у средневозрастных крыс (рис. 1а, 1б, 2а, 2б).

14-дневный курс мексидола вызывал слабое снижение (на 15%) уровня провоспалительных

цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (рис. 1в, 1д, 2в, 2д), в то время как содержание TGF- $\beta$ 1 и BDNF (маркеры противовоспалительного фенотипа) увеличивалось на 60 и 35% соответственно (рис. 1г, 1е, 2г, 2е).

Полученные результаты свидетельствуют о способности сукцинатсодержащего препарата

мексидола индуцировать противовоспалительную поляризацию микроглии в условиях хронического умеренного воспаления в стареющем мозге. Морфофункциональные изменения стареющей микроглии остаются малоизученными, также как причины формирования устойчивого к фармакологической коррекции M1-подобного провоспалительного фенотипа [29]. В нашем исследовании показано, что уровень экспрессии провоспалительных маркеров микроглии слабо увеличивается при старении, в то время как уровень маркеров противовоспалительного M2-фенотипа микроглии (CD206, TGF- $\beta$ 1, BDNF) снижался значительно. Таким образом, одной из вероятных причин развития асептического нейровоспаления и формирования провоспалительного состояния микроглии в стареющем мозге может быть возрастзависимое снижение уровня важнейших регуляторов противовоспалительного ответа, таких как глюкокортикоиды, половые и тиреоидные гормоны, подавляющие активность главного провоспалительного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B [30].

Наблюдаемый эффект противовоспалительной поляризации микроглии под действием ЭМПП сукцината (мексидола) могут быть опосредованы сукцинатным рецептором SUCNR1, конститутивно экспрессируемым микроглией [7]. В нашей предшествующей работе [23] было показано, что курсовое введение мексидола в дозах 40 и 100 мг/кг вызывало в КГМ молодых, средневозрастных и старых крыс дозозависимое увеличение содержания фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), что является хорошо известным эффектом активации SUCNR1 в мозге [31]. Изолированное введение ЭМПП в количествах, эквивалентных его содержанию в применяемых дозах мексидола, не влияло на экспрессию VEGF, что свидетельствует о вовлеченности сукцината и сукцинат/SUCNR1-сигналикации в обнаруженный ангиогенный эффект мексидола.

В настоящем исследовании влияния курсового применения мексидола на поляризацию микроглии обращает внимание отсутствие заметных эффектов у молодых и средневозрастных животных. Одной из возможных причин ограничения регуляторного влияния сукцинат/SUCNR1-сигналикации на формирование противовоспалительного фенотипа микроглии у молодых животных может быть высокая экспрессия/активность митохондриальной СДГ, осуществляющей окисление янтарной кислоты и, тем самым, ограничивающей эффективность сукцинатной сигнализации. В нашем исследовании у молодых и средневозрастных крыс уровень экспрессии каталитической субъединицы СДГ (SDHA, рис. 1з, 2з) превосходил ее содержание у старых животных на 30%. Более того, у молодых и средневозрастных

крыс курсовое введение мексидола сопровождалось быстрой и значительной индукцией SDHA (в 1.5–1.7 раз), что происходило сопряженно с увеличением содержания сукцинатного рецептора SUCNR1 в КГМ (рис. 1ж, 2ж). У старых крыс уровень SUCNR1 был снижен на 40% в сравнении с молодыми и взрослыми крысами, а увеличение содержания SUCNR1 до его уровня у средневозрастных крыс и слабая индукция SDHA наблюдались только после продолжительных (7- и 14-дневные) курсов мексидола (рис. 1ж, 1з, 2ж, 2з).

Поскольку митохондрии являются главным источником сукцината старческая супрессия митохондриогенеза и редукция митохондриального аппарата при старении [32] сопровождаются снижением продукции сукцината, уровня экспрессии SUCNR1, ослаблением межклеточной сукцинатной сигнализации между нейронами, астроцитами и микроглией, подавлением SUCNR1-зависимых адаптивных механизмов, что в целом может потенцировать провоспалительную поляризацию стареющей микроглии.

При обсуждении механизмов выявленной противовоспалительной активности сукцинатсодержащего препарата мексидола необходимо подчеркнуть, что регуляторные влияния внеклеточного сукцината и внутриклеточного сукцината могут оказывать противоположные эффекты на развитие воспалительной реакции [2, 3]. В ЦНС внеклеточный сукцинат активировал специфический рецептор SUCNR1 на поверхности нейронов, астроцитов и микроглиоцитов (резидентные иммунные клетки ЦНС) [7, 11, 13]. SUCNR1 принадлежит к классу рецепторов, сопряженных с G-белком (G-protein-coupled receptors, GPCRs). В гетеротримерных G-белках ( $G\alpha\beta\gamma$ )  $G\alpha$ -субъединица определяет специфичность связывания с рецептором и внутриклеточным эффектором. В настоящее время SUCNR1 ЦНС рассматривают как  $G\alpha_q$ -,  $G\alpha_i$ -сопряженный рецептор [33]. Активация  $G\alpha_i$ -белка связана с ингибированием аденилатциклазного сигнального пути, инициацией сигнальных каскадов митоген-активируемых протеинкиназ (ERK1/2), контролирующей пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток, продукцию провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  [7], что предопределило формирование представления о сукцинате как усилителе (алармин) воспалительной реакции. Однако прямая стимуляция дендритных клеток сукцинатом не вызывает индукцию провоспалительных цитокинов [2]. Противовоспалительная/регенеративная активность миелоидных клеток считается опосредованной активацией  $G\alpha_q$ -белка и развитием внутриклеточного кальциевого каскада. Примерами таких  $G\alpha_q$ -сопряженных рецепторов являются лактатный и пуриновый P2Y1-рецепторы, контролирующие про-

тивовоспалительную поляризацию миелоидных клеток [33]. Хорошо известная для сукцинатного рецептора мобилизация внутриклеточного кальция, связываемая с активацией  $G\alpha_q$ -белка, объясняется также активностью гетеродимера  $G\beta\gamma$   $G_i$ -белка.  $G\beta\gamma$ -зависимая активация фосфолипазы C (PLC $\beta$ ) и последующая мобилизация внутриклеточного кальция [33] активирует  $Ca^{2+}$ /кальмодулин (CaM)-зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют/активируют транскрипционный фактор CREB, контролирующий экспрессию генов противовоспалительных факторов, таких как PGC-1 $\alpha$ , IL-10 [34, 35]. Транскрипционный коактиватор PGC-1 $\alpha$  необходим в развитии регенеративной/противовоспалительной M2-поляризации макрофагов, блокирует активацию главного провоспалительного фактора транскрипции NF-kB [36], контролирующего экспрессию провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), и активирует ключевые противовоспалительные транскрипционные факторы PPARs и ERRs, ответственные за усиление процессов митохондриогенеза и окислительного фосфорилирования, характеризующих M2-фенотип макроглии/макрофагов [9, 24]. Активатором PPAR, по данным хемореактивного анализа, также может служить этилметилгидроксипиридин мексидола [37].

В настоящее время определяющая роль регуляторной оси сукцинат/SUCNR1 в ограничении воспалительной реакции находит все больше подтверждений, а состояние устойчивого воспаления связывают с недостаточной экспрессией рецептора SUCNR1 иммунными клетками и/или дефектами структуры SUCNR1 [12].

Важно отметить, что внутриклеточный сукцинат вовлекается в провоспалительную поляризацию макроглии/макрофагов, что было детально изучено ранее и осуществляется по SUCNR1-независимому механизму. Провоспалительная поляризация макрофагов может быть вызвана гипоксией/ишемией, провоспалительными сигналами (патогены, лиганды TLRs, воспалительные цитокины, интерфероны), связана с активацией и стабилизацией NF-kB, HIF-1 $\alpha$ , инициирующих экспрессию воспалительных цитокинов и прооксидантных ферментов, а также блокаду ЦТК на уровне изоцитратдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, что сопровождается внутриклеточной аккумуляцией сукцината. Сукцинат ингибирует пролигидроксилазы, инициирующие деградацию HIF-1 $\alpha$  и деактивацию NF-kB, и, тем самым, усиливает воспалительную реакцию [2, 9, 24, 26].

Таким образом, сукцинат может играть двойную роль в воспалении: как активатор на ранних стадиях воспаления (внутриклеточный сукцинат, SUCNR1-независимый клеточно-автономный ме-

ханизм) и на более поздних стадиях как фактор ограничения воспаления (внеклеточный сукцинат, механизм SUCNR1-зависимого межклеточного взаимодействия) [2].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые исследовано влияние этилметилгидроксипиридина сукцината (мексидола) на поляризацию макроглии в стареющем мозге. 14-дневное курсовое в/б введение препарата (100 мг/кг) вызывало увеличение уровня экспрессии маркеров противовоспалительного M2-фенотипа макроглии в коре головного мозга старых крыс, что свидетельствует о вовлечении сукцинат/SUCNR1-сигнализации в M2-противовоспалительную поляризацию резидентных иммунных клеток при хроническом умеренном нейровоспалении в стареющем мозге. Данные развивают представления о церебральных эффектах сигнальной системы сукцинат/SUCNR1 и раскрывают механизм противовоспалительной активности мексидола.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Источники финансирования.** Работа выполнялась в рамках программы исследований “Патогенетические механизмы нейродегенеративных заболеваний и разработка их комплексной терапии” № 0520-2019-0029, запланированных в ФГБНУ “НИИ Общей патологии и патофизиологии”.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. He W., Miao F.J.P., Lin D.C.H., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J., Chen J.L., Tian H., Ling L. 2004. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. **429**, 188–193.
2. Grimolizzi F., Arranz L. 2018. Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood. *Haematologica*. **103** (10), 1586–1592.
3. Guo Y., Cho S.W., Saxena D., Li X. 2020. Multifaceted actions of succinate as a signaling transmitter vary with its cellular locations. *Endocrinol. Metab.* **35**, 36–43.
4. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. 2015. Mitochondria-controlled signalling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front. Neurosci.* **9**, 1–13.
5. Rubic T., Lametschwandner G., Jost S., Hinteregger S., Kund J., Carballido-Perrig N., Schwärzler C., Junt T., Voshol H., Meingassner J.G., Mao X., Werner G., Rot A., Carballido J.M. 2008. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* **9**, 1261–1269.
6. Caielli S., Veiga D. T., Balasubramanian P., Athale S., Domic B., Murat E., Banchereau R., Xu Z., Chan-

- dra M., Chung C.-H., Walters L., Baisch J., Wright T., Punaro M., Lorien N., Stewart K., Fuller J., Ucar D., Ueno H., Zhou J., Banchereau J., Pascual V. 2019. A CD4<sup>+</sup> T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat. Med.* **25** (1), 75–81.
7. Krzak G., Willis C.M., Smith J.A., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. 2021. Succinate receptor 1: An emerging regulator of myeloid cell function in inflammation. *Trends Immunol.* **42** (1), 45–58.
  8. Littlewood-Evans A., Sarret S., Apfel V., Loesle P., Dawson J., Zhang J., Muller A., Tigani B., Kneuer R., Patel S., Valeaux S., Gommermann N., Rubic-Schneider T., Junt T., Carballido J.M. 2016. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213** (9), 1655–1662.
  9. Diskin C., Palsson-McDermott E.M. 2018. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front. Immunol.* **9**, 270.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00270>
  10. Harber K.J., de Goede K.E., Verberk S.G.S., Meinster E., de Vries H.E., van Weeghel M., de Winther M.P.J., Van den Bossche J. 2020. Succinate is an inflammation-induced immunoregulatory metabolite in macrophages. *Metabolites.* **10** (9), 372.  
<https://doi.org/10.3390/metabo10090372>
  11. Peruzzotti-Jametti L., Bernstock J.D., Vicario N., Costa A.S.H., Kwok C.K., Leonardi T., Booty L.M., Bucci I., Balzarotti B., Volpe G., Mallucci G., Manferri G., Donega M., Iraci N., Braga A., Hallenbeck J.M., Murphy M.P., Edenhofer F., Frezza C., Pluchino S. 2018. Macrophage-derived extracellular succinate licenses neural stem cells to suppress chronic neuroinflammation. *Cell. Stem. Cell.* **22** (3), 355–368.
  12. Keiran N., Ceperuelo-Mallafre V., Calvo E., Hernandez-Alvarez M.I., Ejarque M., Nunez-Roa C., Horrillo D., Maymo-Masip E., Rodriguez M.M., Fradera R., de la Rosa J.V., Jorba R., Megia A., Zorzano A., Medina-Gomez G., Serena C., Castrillo A., Vendrell J., Fernandez-Veledo S. 2019. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat. Immunol.* **20** (5), 581–592.
  13. Rodriguez-Gomez J.A., Kavanagh E., Engskog-Vlachos P., Engskog M.K.R., Herrera A.J., Espinosa-Oliva A.M., Joseph B., Hajji N., Venero J.L., Burguillos M.A. 2020. Microglia: Agents of the CNS pro-inflammatory response. *Cells.* **9** (7), 1717.  
<https://doi.org/10.3390/cells9071717>
  14. Воронина Т.А. 2009. Мексидол: основные нейрорепродуктивные эффекты и механизм действия. *Фарматека.* **180** (6), 1–4.
  15. Воронина Т.А. 2012. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* **112** (12), 86–90.
  16. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. 1995. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М.: Ин-та биомед. химии РАН. 271 с.
  17. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Новикова А.В. 2013. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина. *Вестник Смоленской гос. мед. академии.* **12** (3), 56–66.
  18. Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Черных И.В. 2014. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* **114** (8), 169–172.
  19. Лукьянова Л.Д. 2019. Сигнальные механизмы гипоксии. М.: РАН. 215 с.
  20. Шулькин А.В. 2012. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов in vitro. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* **112** (2), 35–39.
  21. Воронина Т.А., Кутепова О.А. 2003. Влияние антиоксиданта из класса 3-оксипиридина на функциональную активность центральной нервной системы мышей разных возрастных групп. *Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* **38** (6), 1126–1131.
  22. Воронина Т.А. 2020. Геропротективные эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментальном исследовании. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* **120** (4), 81–87.
  23. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. 2020. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* **120** (1), 62–69.
  24. Jiang C.T., Wu W.F., Deng Y.H., Ge J.W. 2020. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Mol. Med. Reports.* **21** (5), 2006–2018.
  25. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J., Schulz R. 2015. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX.* **2**, 440–445.
  26. Amici S.A., Dong J., Guerau-de-Arellano M. 2017. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front. Immunol.* **8**, 1520.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01520>
  27. Furman N.T., Gottlieb A., Prabhakara K.S., Bedi S., Caplan Henry W., Ruppert K.A., Srivastava A.K., Olson S.D., Cox Jr. C.S. 2020. High-resolution and differential analysis of rat microglial markers in traumatic brain injury: Conventional flow cytometric and bioinformatics analysis. *Sci. Report.* **10**, 11991–12005.
  28. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. 2020. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 198.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
  29. Angelova D.M., Brown D.R. 2019. Microglia and the aging brain: Are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J. Neurochem.* **151**, 676–688.
  30. Luo Y., Zheng S.G. 2016. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* **7**, 604.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00604>
  31. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallee M., Hou X., Lavoie J.-C., Mitchell G., Mamer O.A., Chemtob S. 2014. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral

- hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 285–293.
32. Bratic A., Larsson N.-G. 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123** (3), 951–957.
33. Gilissen J., Jouret F., Pirotte B., Hanson J. 2016. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol. Ther.* **159**, 56–65.
34. Greer P.L., Greenberg M.E. 2008. From synapse to nucleus: Calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron.* **59** (6), 846–860.
35. Kitagawa K. 2007. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS J.* **274**, 3210–3217.
36. Eisele P.S., Salatino S., Sobek J., Hottiger M.O., Handschin C. 2013. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha/\beta$  (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **288** (4), 2246–2260.
37. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э., Семенов В.А. 2016. Сравнительный хемореактомный анализ мексидола. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* **4**, 19–30.

## Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Induces Anti-inflammatory Polarization of Microglia in the Aging Rat Brain

Y. I. Kirova<sup>1</sup>, \*, F. M. Shakova<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

<sup>2</sup>*Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315 Russia*

\*e-mail: bioenerg@mail.ru

The succinate receptor SUCNR1 (GPR91) is constitutively expressed by the main populations of immunocytes. Succinate, as an immunometabolite (metabokine), performs SUCNR1-dependent modulation of the morphofunctional state of immune cells and appears an important regulator of innate and adaptive immunity and tissue homeostasis. Contradictory interpretations of the role of succinate signaling in the functioning of macrophages, the lack of studies of the SUCNR1 effect on the microglial morphofunctional transformation, the problem of low permeability of the blood–brain barrier (BBB) for any promising succinate analogs predetermined this study. The aim of this work was to assess the effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the polarization of microglia during chronic inflammation in the aging brain. The study was performed on white outbred male rats aged 3 (young), 6 (adult), and 18 (old) months. The drug Mexidol (2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate) was used as a form of succinate that overcomes the BBB. Mexidol was injected intraperitoneally in a dose of 100 mg/kg daily for 3, 7, or 14 days. The surface markers of pro-(M1) and anti-inflammatory (M2) microglia phenotypes (CD86 and CD206, respectively), cytoplasmic marker of microglia Iba1, as well as proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (expressed by M1 microglia), immunosuppressing cytokine TGF- $\beta$ 1, and neurotrophin BDNF (expressed by M2 microglia) were detected in cerebral cortex samples by immunoblotting. It was shown that the expression of cell markers of pro- (CD86) and especially of anti-inflammatory microglia (CD206) is reduced in old rats, however, the level of the Iba1, expressed regardless of the phenotype, remains unchanged in all studied groups. This indicates the maintenance of quantitatively equivalent microglial populations in different age groups. At the same time, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were increased, and the content of TGF- $\beta$ 1 and BDNF was significantly lower in old rats than in young and adult rats. In general, the data obtained indicate the predominance of the pro-inflammatory status of microglia in the aging brain. After a 14-day course of Mexidol, the level of CD86 in old rats decreased slightly, and CD206 increased by 45%, reaching the level of CD206 in 6-month-old rats. The increase in CD206 expression occurred in conjunction with an increase in the level of TGF- $\beta$ 1 and BDNF by 60% and 35% respectively, which indicates the involvement of the succinate/SUCNR1 signaling in the anti-inflammatory polarization of microglia in the aging brain. The obtained data develop concepts about the cerebral effects of succinate/SUCNR1 signaling and reveal a new component of the mechanism of the neuroprotective action of Mexidol.

**Keywords:** ethylmethylhydroxypyridine succinate, SUCNR1, microglia, neuroinflammation, aging, rats

УДК 577.3:612.014

## ПРИСУТСТВИЕ АЗУЛЕНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ТЕСТ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ОЗОНУ

© 2022 г. В. В. Рощина<sup>а, \*</sup>, А. В. Кучин<sup>а</sup>, А. Р. Куньев<sup>а</sup>,  
Г. А. Солгани<sup>б</sup>, Л. М. Хайбулаева<sup>а</sup>, Н. К. Призова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

<sup>б</sup>Сочинский национальный парк, Сочи, 354002 Россия

\*e-mail: roshchinavic@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята к публикации 08.06.2021 г.

Исследованы реакции на озон поверхностных клеток листьев и хвои пяти интродуцированных древесных видов дендрария Сочинского национального парка в хронической экспозиции в течение трех дней в общих дозах до 0.05 мкл/л. У секреторных структур серебристых листьев *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex. Benth в клетках наблюдались заметные изменения поглощения (выцветания) и автофлуоресценции. Голубая и серебристая хвоя видов *Picea pungens* Engelm. cv. *Argentea*, *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière cv. *Argentea*, *Pinus parviflora* Siebold & Zucc. cv. *Glauca* и листья *Acacia dealbata* Link. практически не были чувствительны к озону. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки этих растений включали азуленины. Предполагается, что именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у данных видов, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность для клеток к озону.

**Ключевые слова:** клеточная стенка, кутикула, поглощение, секреторные клетки, флуоресценция

**DOI:** 10.31857/S023347552201008X

### ВВЕДЕНИЕ

Растения чувствительны к тропосферным загрязнителям воздуха, например, озону. В субтропиках России эта проблема особенно актуальна. Урбанизированная среда крупных курортов, таких как Сочи, может производить высокие концентрации этого газа под влиянием выхлопов автотранспорта. Это значительно влияет на рост и развитие интродуцированных древесных видов. Ввиду этого актуально изучение клеточных механизмов их чувствительности и устойчивости к озону.

При анализе сложившихся представлений (рис. 1) нужно было установить малоисследованные пути транспорта озона в растение. До недавнего времени в литературе основным транспортным потоком O<sub>3</sub> в растение считались устьица с открытой щелью [1–3] и не учитывался тот факт, что при жаркой погоде необходимость сохранения влаги приводит к их закрытию. Тогда именно вся поверхность растений с закрытыми устьицами чувствительна к изменениям концентрации тропосферного озона. В реальности эти возможности есть и при открытых устьицах, когда концентрация озона очень высока, а пропускная спо-

собность устьичной щели ограничена. Механизм действия озона (рис. 1) зависит главным образом от глубины проникновения в клетку через клеточную оболочку [4]. В этой ситуации воспринимают внешние сигналы компоненты поверхности — клеточная стенка и плазмалемма, а также сенсорами могут быть и секреты специализированных секреторных клеток (железы, волоски и др.). Недавно было установлено заметное повреждение таких клеток в кратковременном остром опыте и при хроническом воздействии озоном [5, 6]. Часто секреторные структуры поверхности растения представляют собой открытые или открывающиеся время от времени резервуары с секретом.

Секрет сложного состава может включать белки, амины, фенолы и другие соединения. Например, у эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* гистохимически обнаружены холинэстераза [7] и биогенные амины (гистамин и дофамин) [5, 7]. Ранее установлено ингибирующее влияние озона на этот фермент *in vitro* [8], который представляется мишенью для озона. Во всех случаях роль первичного сенсора и мишеней выполняют компоненты клеточной стенки и соединения свободного пространства клетки — апопласта, в первую

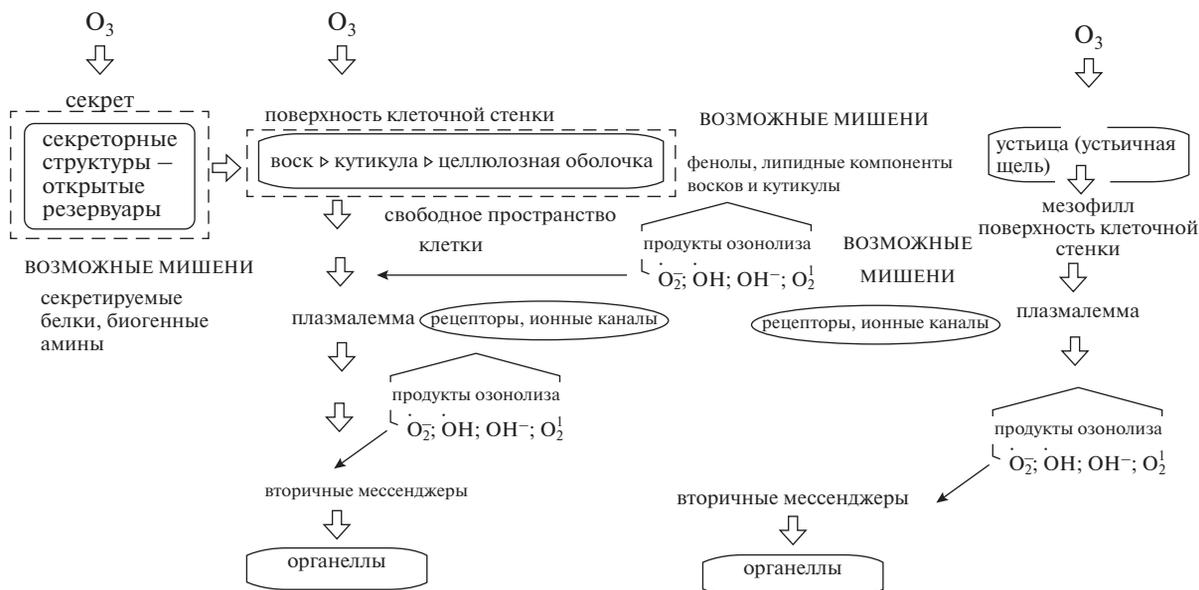


Рис. 1. Схема взаимодействия озона с растительной клеткой по данным литературы [1, 4]. Прерывистой линией показаны неисследованные пути проникновения газа.

очередь воспринимающие внешние сигналы [4]. Однако до сих пор не исследованы другие участники сенсорных реакций. Обычно рассматриваются образование активных форм кислорода и их первичное связывание с антиоксидантами поверхности (в основном фенолами клеточной стенки). Только после этого, часть несвязанного озона и образованных активных форм кислорода реагирует с плазмалеммой. Появившиеся на этом этапе активные формы кислорода – свободные радикалы, перекиси и синглетный кислород, а также остатки несвязанного озона могут действовать уже как внешние сигналы, которые передаются от плазмалеммы внутрь клетки через системы вторичных мессенджеров (ионов кальция, инозиттрифосфата и др.) [4].

При взаимодействии озона с клеткой первый этап контакта с поверхностью может определять устойчивость определенного вида растения к этому окислителю. У некоторых растений поверхность листьев и стеблей имеет голубой или серебристый цвет. Это не просто отражение воздушных участков. Среди таких видов подобную окраску имеют некоторые эвкалипты и хвойные растения. Относительная устойчивость эвкалиптов разных видов к озону была показана австралийскими исследователями [9]. У голубых и серебристых видов сосны *Pinus parviflora*, ели *Picea pungens* и других проростки в разной степени устойчивы к озону [10]. Голубой или серебристый цвет поверхностей указанных растений может быть связан с присутствием синих пигментов азуленов. Известно также, что листья эвкалипта *Eucalyptus cinerea* с серебристой поверхностью со-

держат голубой пигмент сесквитерпен, азулен [11]. До сих пор возможной роли азуленов в чувствительности к озону не уделялось внимания.

Целью нашей работы является исследование реакций на озон растительных клеток, на поверхности которых могут быть азулены.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты.** В качестве объектов исследований с голубыми поверхностными секреторными структурами выбраны древесные виды, устойчивые к озону: листья эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth (Myrtaceae), а также хвоя ели колючей Серебристой *Picea pungens* Engelm. cv. *Argentea* (Pinaceae), кедра атласского Серебристого *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière cv. *Argentea* (Pinaceae), сосны мелкоцветковой Голубой *Pinus parviflora* Siebold & Zucc. cv. *Glauca* (Pinaceae), собранных в 2019–2020 годах в дендрарии Сочинского национального парка г. Сочи и дендропарке “Южные культуры” Кавказского заповедника, Адлер.

Кроме того, использовались листья комнатных саженцев эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth, на них мы оценивали эффекты озона на поверхностные секреторные структуры – железы.

**Озонирование.** Свежие листья растений на воздухе подвергались воздействию озоном 0.05 мкл/л, 5 ч в день в течение 3 дней. Озон производился генератором КПМЗ (Россия) [5, 6].

**Спектральные методы.** Поглощение и собственную флуоресценцию клеток измеряли непо-

средственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров Spesord M-40 (Германия), Unicam Helios-epsilon (США), микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Россия), спектрофлуориметра Perkin-Elmer 350 MPF-44B (Великобритания) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия). Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа Leica DM 6000 B (Германия), вышеупомянутых конфокального микроскопа и микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 с камерой Levenhuk M300 Base (Россия). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном из клеток (1 : 10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 ч и более) в 0,5 см кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью вышеупомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра.

**Хроматография.** Для выявления азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля Silufol, как описано ранее для пыльцы ряда семенных растений и микроспор хвоща [12, 13]. Затем регистрировали их спектры поглощения и флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными на интактных клетках.

Концентрацию азуленов ( $A$ ) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:  $A = D_{580}/\epsilon l$ , где  $D_{580}$  — оптическая плотность при 580 нм,  $\epsilon$  — коэффициент молярной экстинкции  $328 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ,  $l$  — толщина слоя жидкости в кювете, см.

В работе использовали азулен (Fluka, Германия).

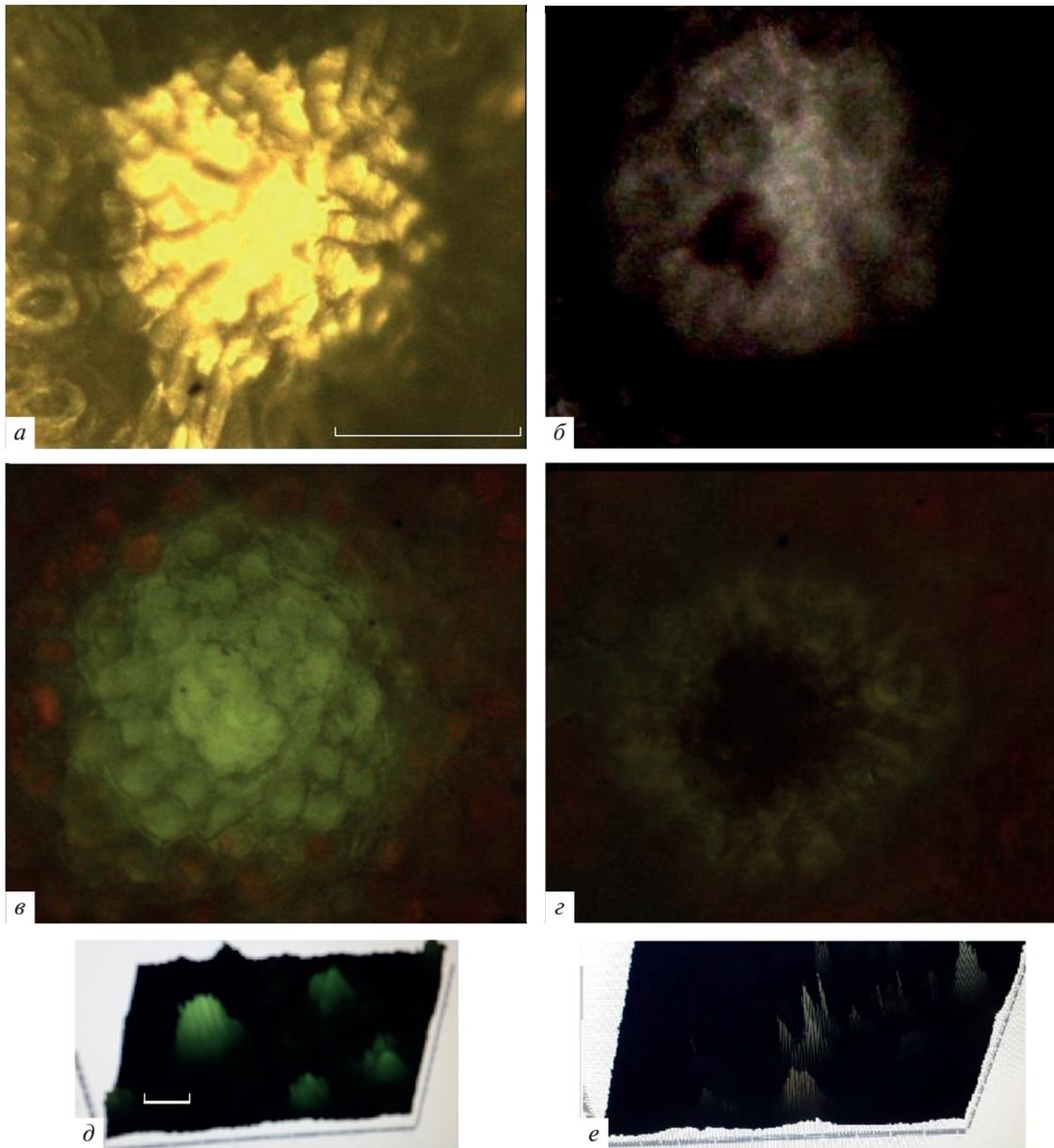
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделями для работы были выбраны растения, листья или хвоя которых содержат растворимые в маслах азулены или где предполагается их присутствие. Это представляло интерес, поскольку липофильные секреторные структуры (масляные железы и смоляные ходы) специально как сенсоры озона не изучены. Наши исследования включали микроскопический и спектральный анализ поверхности листа или хвои с секреторными структурами до и после экспозиции с озоном в более естественных дозах 0.05 мкл/л по 5 ч в день в течение 3 дней. Основное внимание уделялось их спектральным характеристикам.

**Спектральные характеристики секреторных структур.** Среди исследованных видов у высушенных на воздухе целых листьев эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* с поверхностными секреторными структурами ранее [5, 6] наблюдали выцветание оранжевых, желтых и красных масляных желез после экспозиции с озоном как в остром

опыте в общей дозе 0.7 мкл/л за 10 мин, так и хроническом (доза 0.05 мкл/л за 5 ч в день за 3 дня). В обоих вариантах за время экспозиции заметно снизился уровень пигментации клеток при окислении [7]. В настоящей работе мы рассмотрели изменения спектральных характеристик свежих листьев и высушенной на воздухе хвои. Наиболее выразительные данные на секреторных структурах получены для эвкалипта. На рис. 2б показано, что зеленовато-желтый цвет желез (рис. 2а) эвкалипта почти исчезает после обработки озоном. Сложная многоклеточная структура при этом открывается, внутри виден красный секрет. Железа была способна флуоресцировать в зеленой области спектра под люминесцентным микроскопом (рис. 2в), в основном при возбуждении светом в области 460–480 нм [6]. Озон также снижает уровень ее флуоресценции. Объемная картина (3D) поверхности листа, воспринимающей озон, показывает резкое снижение свечения желез, выступающих как антенны над поверхностью (рис. 2д, 2е). Наблюдалось также снижение поглощения листа с железами при 580 нм, области характерной для спектра поглощения азулена, и в области хлорофилла (666 нм). Но некоторым азуленам свойственны максимумы и в области, относящейся к хлорофиллу [14]. Отметим, что озон вызывает снижение поглощения при 580 и 666 нм не только самой железой, но и несекреторных клеток, которые ответственны за серебристо-голубоватую окраску листа в целом. Автофлуоресценция этой секреторной структуры также снижается под действием озона.

В спектре флуоресценции (рис. 3), полученном с помощью лазер-сканирующего конфокального микроскопа, железа (1 и 2) и связанный с ней масляный проток (3) флуоресцируют с максимумами 535–540 нм. Отметим, что в середине секреторной структуры (1) виден максимум 515 нм и плечо 535 нм, а в несекреторных клетках (4) преобладает хлорофилл с максимумом 680 нм. Под действием озона уровень эмиссии сильно снижается: более чем на 100 отн. ед., что видно изначально по спектрам на рис. 3. Отметим возможный вклад в наблюдаемое свечение для известных соединений. Максимумы флуоресценции в голубой или зелено-желтой области спектра могут быть свойственны и некоторым фенолам, например, флавоноидам [5]. Ранее нами показано [6], что у листьев изучаемого вида эвкалипта в спектре эмиссии есть свойственные фенолам пики при 450 и 470 нм, которые не исчезают даже после высокой дозы озона и легко обнаруживаются в водных смывах. Возможная роль фенолов в защите поверхности от повреждающего действия озона обсуждалась в указанной работе. Но в данном исследовании мы сфокусировали внимание на терпенах, которыми обогащен эвкалипт. Они флуоресцируют в области 400–440 нм. Среди

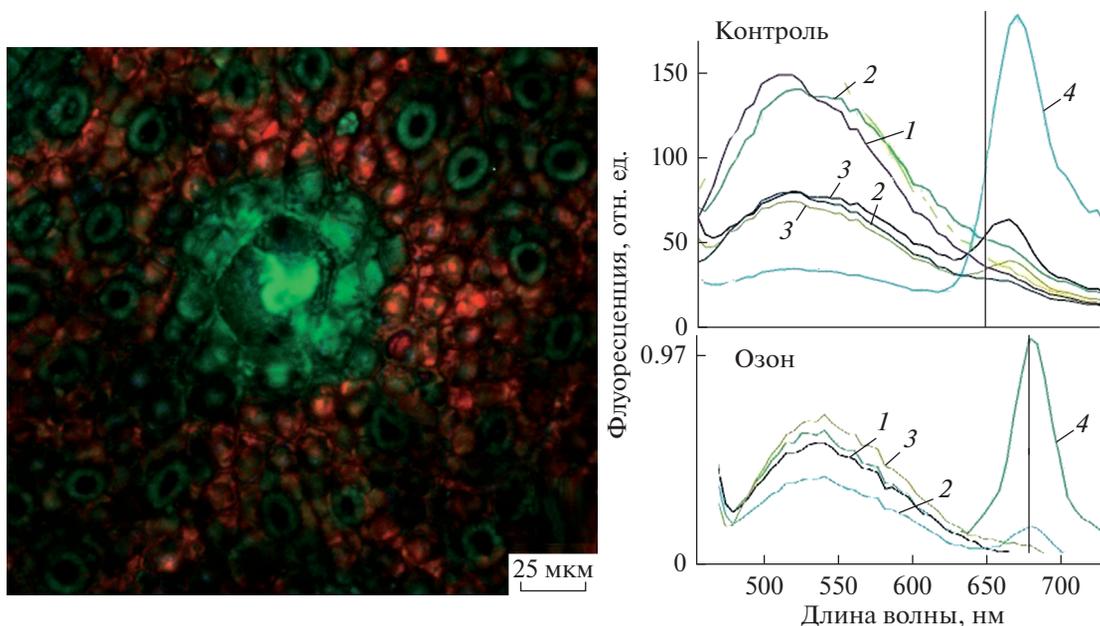


**Рис. 2.** Вид секреторной структуры – железы эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* до (а, в) и после воздействия озоном 0.05 мкл/л (б, з) – под люминесцентным микроскопом. а, б – проходящий свет, в, з – флуоресценция при возбуждении светом 460–480 нм; д, е – 3D-изображение флуоресцирующей поверхности без и с обработкой озоном по программе камеры Levenhuk. Шкала – 100 мкм.

таких соединений известны голубые пигменты – азулены, найденные у эвкалипта [11].

В отличие от эвкалипта, в клетках хвои использованных серебристых и голубых видов внешних изменений под действием озона не было выявлено, как и достоверных изменений в спектрах поглощения и флуоресценции. Смоляные ходы были бесцветны и не флуоресцировали. Заметных спектральных сдвигов не обнаружено в клетках голубоватых листьев *Acacia dealbata*. Можно предположить, что этого не произошло

благодаря детоксикации – связыванию озона на поверхности клеток указанных видов, довольно устойчивых к озону по литературным данным [1–3] и поэтому отобранных для экспериментов. Как показал наш опыт, синий цвет к поверхности испытуемых образцов не может принадлежать водорастворимым антоцианам при  $pH > 7$ , так как добавление щелочи или кислоты не привело к изменению голубой окраски. Следовало проверить присутствие в этих образцах другого пигмента, азулена, синего ароматического углеводорода,



**Рис. 3.** Конфокальная микроскопия поверхности листа эвкалипта пепельного. Слева — флуоресцирующая железка листа, сумма оптических срезов через 2 мкм в трех каналах. Справа — спектры автофлуоресценции до и после воздействия на клетки озоном в общей дозе 0.05 мкл/л. Возбуждение флуоресценции — лазер 458 нм. 1 и 2 — середина и обкладка железы, 3 — проток с секретом, 4 — клетки вне железы.

обладающего уникальной химической структурой и важными биологическими свойствами.

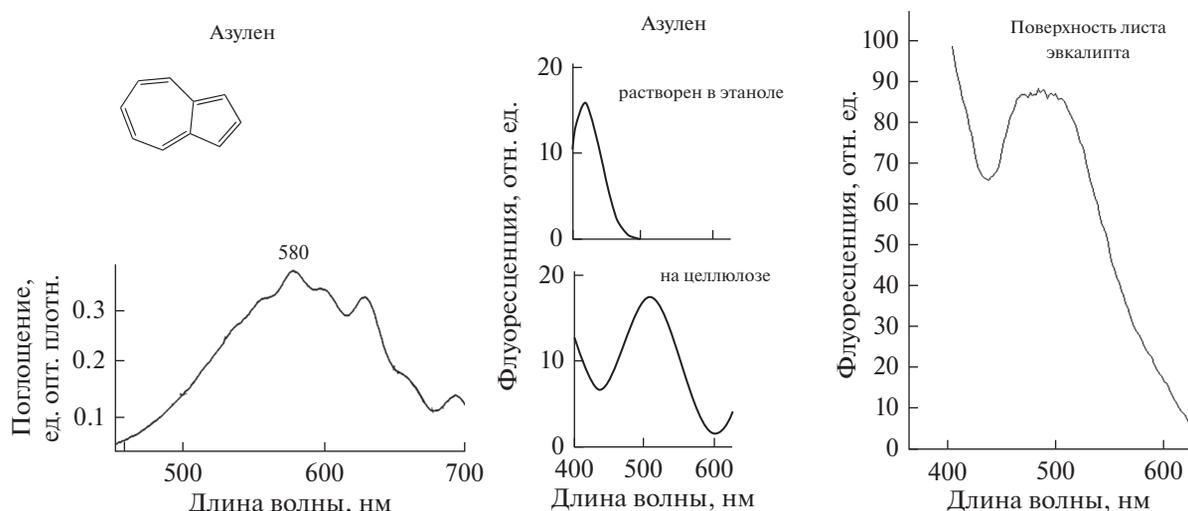
**Обнаружение азуленов.** Азулены являются липофильными веществами, сильно окрашенными в синий, фиолетовый, иногда в зеленый цвет (S-гвайазулен существует в виде сине-фиолетовых ромбических пластинок) [14]. Пластины видны в проходящем свете микроскопа при большом увеличении. Они легко растворяются в этаноле и других органических растворителях, не растворяются в воде, но перегоняются с эфирными маслами, связываются с концентрированными кислотами за счет образования комплексов. К щелочам азулены индифферентны, а при доступе воздуха и на интенсивном свете окисляются с разрывом двойной связи. Тогда происходит изменение синей и фиолетовой окраски на зеленую, желтую или коричневую. Тоже предполагается и в кутикуле, покрывающей поверхность листа.

На рис. 4 приведены основная формула и спектральные данные для синтетического азулена. Голубой цвет этого вещества соответствует основному максимуму 580 нм в спектре его поглощения. Разнообразие включений в скелет данного азулена боковых групп в природе дает также пики в области 570–625 нм [14]. Раствор азулена в этаноле имеет максимум флуоресценции 400–410 нм, а после включения его в целлюлозу — 510–520 нм. Микроспектрофлуориметрия серебристо-голубой поверхности целого листа эвкалипта (на всех участках, включая секреторные клетки)

показывает максимум 510–520 нм в спектре флуоресценции (рис. 4), как и в модельном эксперименте с целлюлозой [12]. Подобное сходство дает основание для поиска азуленов в наших образцах и обсуждения их возможной защитной роли от озона и образуемых активных форм кислорода при взаимодействии с клетками поверхности растений.

Предположение о защитной роли азуленов в кутикуле на поверхности листьев и хвои проверялось нами в опытах с экстрактами. Голубая окраска может принадлежать самой клеточной стенке или слою кутикулы, покрывающей ее поверхность. Кутикула представляет собой слой из липидных компонентов (кутина, суберина и восков) клеточных оболочек эпидермиса. Воска удаляются органическими растворителями, что нами было сделано на образцах 96% этанолом или 100% ацетоном. После этого, поверхность листьев эвкалипта, акации и хвои сосны, ели и кедра лишилась голубоватой или серебристой окраски.

В табл. 1 и на рис. 5 представлены данные о появлении азуленов с максимумами поглощения 600–610 нм в экстрактах образцов с голубой поверхностью клеток у исследованных видов. Время появления азуленов в экстракте показывает, насколько глубоко в клеточной стенке, покрытой воском, располагаются азулены. Обнаружение в экстракте максимумов поглощения 665 нм или флуоресценции 680 нм, относящихся к хлорофиллу, свидетельствует, что растворитель (ацетон



**Рис. 4.** Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) синтетического азулена (2 мг/мл) в сравнении с флуоресценцией серебристо-голубой поверхности листа эвкалипта.

или этанол) проник через плазмалемму к хлоропластам. Это хорошо видно на спектрах поглощения экстрактов, в частности, у *Pinus parviflora* (рис. 5).

Пигмент заметен уже после 10 мин экстракции, после 60 мин количество его падает, и есть вклад хлорофилла (666 нм, рис. 5). В спектрах флуоресценции (рис. 6) хорошо виден максимум 406–410 нм уже после 10 мин экстракции и небольшой вклад пика 680 нм, принадлежащего хлорофиллу. До 5 мин экстракции практически вклада хлорофилла нет совсем. Спустя 60 мин количество хлорофилла в экстракте возрастает до 5 раз по сравнению с экстракцией в течение 10 мин.

В табл. 1 видно, что медленнее всего экстрагируется азулен из хвои *Cedrus atlantica*. Большая концентрация азуленов есть у листьев эвкалипта, окраска появляется за 40 и более минут экстракции. Наименьшее время (10 мин) требуется для экстракции синего пигмента из хвои *Pinus parviflora*. На хроматограмме фракция делится на две полосы с Rf 0.91 и 0.86. Для листьев эвкалипта и

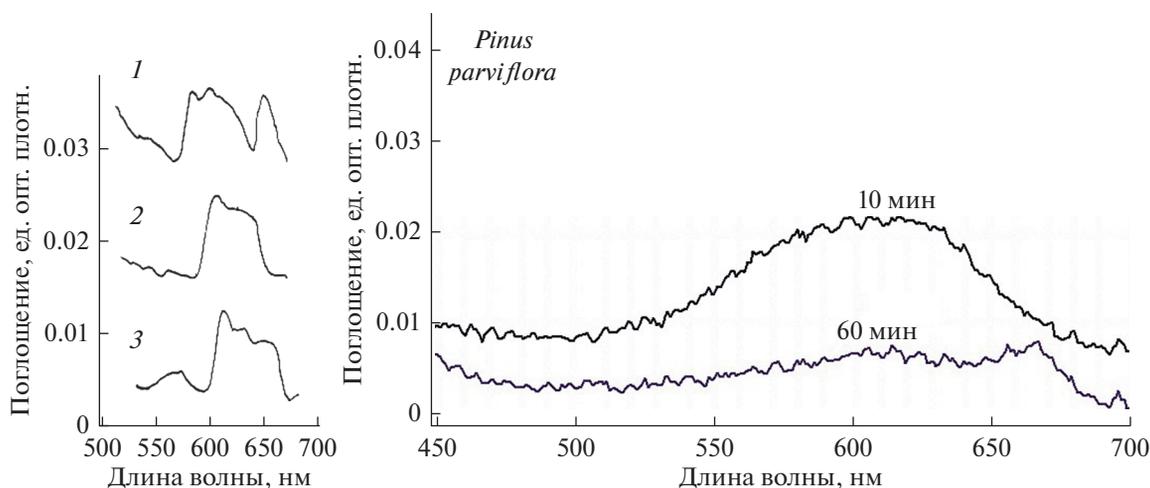
акации отделение азуленовой фракции от хлорофилла и каротиноидов хроматографически происходит после добавления в экстракт серной кислоты (50–60%). У эвкалипта на Whatman 1 появляется четыре голубых полосы с разными Rf 0.52, 0.34, 0.14, 0.06, а у акации – две с Rf 0.67–0.70 и 0.44. Если разделение азуленовых фракций происходило на силикагеле или на Whatman 1, бумаге с пропиткой вазелиновым маслом, то обычно видно по одной широкой полосе с Rf 0.9 или 0.86, а хлорофилл в последнем варианте остается на старте.

Долгие годы химики обнаруживали азулены при отгонке эфирных масел из лекарственных трав полыни горькой *Artemisia absinthium* L. или тысячелистника обыкновенного *Achillea millefolium* L., приобретавших синюю окраску [14]. Но такие пигменты были найдены и в экстрактах органическими растворителями у мхов печеночника *Calypogeia azurea* и др. [15, 16], пыльцы разных цветковых видов и пыльцы-обножки, собранной пчелами [12], клеток микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* L. [13], поверхностных клеток

**Таблица 1.** Время появления в экстракте и содержание азуленов в поверхностном слое клеток растений с голубой окраской

| Вид                       | Максимум в спектре поглощения*, нм | Время появления в экстракте, мин | Концентрация, мкг/г сухой массы |
|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Acacia dealbata</i>    | 607–610                            | 60                               | 475 ± 34                        |
| <i>Cedrus atlantica</i>   | 606–610                            | 480                              | 180 ± 10                        |
| <i>Eucalyptus cinerea</i> | 600                                | 40–60                            | 1256 ± 56                       |
| <i>Picea pungens</i>      | 607                                | 15                               | 550 ± 70                        |
| <i>Pinus parviflora</i>   | 610                                | 10                               | 880 ± 81                        |

\* Максимумы свойственны фенилазулену, по данным работы [14].



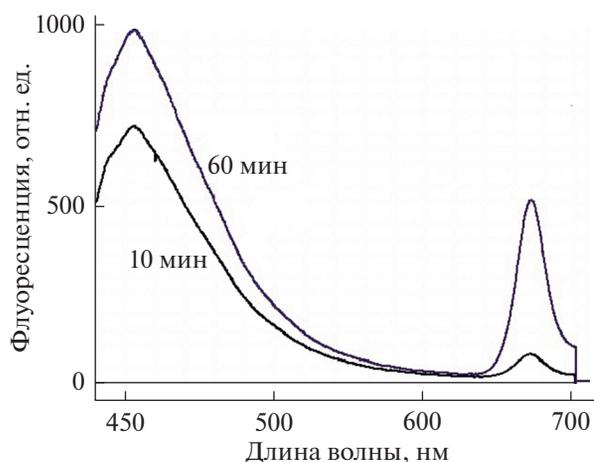
**Рис. 5.** Спектры поглощения синих пигментов из хвои различных видов: 1 – *Cedrus atlantica*, 2 – *Picea pungens*, 3 – *Pinus parviflora*, на хроматографической бумаге Whatman 1. Справа – раствор ацетонового экстракта из хвои *Pinus parviflora* за 10 или 60 мин экспозиции.

хвои голубой ели *Picea excelsa* [17], изолированных хлоропластов гороха *Pisum sativum* L. и клевера *Trifolium repens* L. [17]. В обзоре [14] приводятся также сведения об опытах по обнаружению азуленов в секреторных волосках ряда растений.

Наши данные могут свидетельствовать о локализации азуленов именно в поверхностных клетках древесных растений, поскольку экстракция этих пигментов происходила с поверхности целых неповрежденных клеток уже в первые 10 мин настаивания образцов с растворителем. У листьев эвкалипта с выраженными секреторными структурами допускается присутствие азуленов и в самом секрете, и в поверхностных несекреторных клетках. Серебристый слой на листьях после экстракции ацетоном исчезает. Неясно, весь ли азулен расположен в кутикуле на клеточной стенке (при фильтрации экстрактов выпадает воск кутикулы) или часть этого синего вещества есть в хлоропластах поверхностной клетки. По нашим данным (табл. 1), азулены медленнее всего экстрагируются из хвои кедра атласского *Cedrus atlantica* из-за их более прочного связывания с восками кутикулы на клеточной стенке. Хлорофилл также появляется в этом экстракте не ранее 5 ч настаивания с ацетоном. При этом известно, что оба пигмента найдены в изолированных хлоропластах травянистых растений [17]. Взаимодействие же их и локализация (различная или в каком-то комплексе с хлорофиллом) в этих органеллах совсем не исследованы. Это предполагается сделать в дальнейшем.

При обсуждении полученных результатов следует отметить, что роль азуленов для самих растений до сих пор не рассматривалась в литературе, хотя есть единственная трактовка их свойств как регуляторов роста [18]. По крайней мере, показана,

но, что водорастворимый азулен стимулирует прорастание семян [18]. В составе лекарственных трав эти вещества широко использовали в течение сотен лет в медицинской практике, а сейчас они уже направленно применяются в антиаллергической, антибактериальной и противовоспалительной терапии [19]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, азулен и его производные с множеством двойных связей и их конъюгированные биологически активные соединения нашли применение в технологии, особенно в оптоэлектронных устройствах [20]. В опытах с экзогенным азуленом на вегетативных микроспорах хвоща показаны свойства этого сесквитерпена как антагониста гистамина [21]. В этом случае понятно, что пятичлен в молекуле азулена может замещать гистамин при рецепции на соответствующую



**Рис. 6.** Спектры флуоресценции ацетоновых экстрактов из хвои *Pinus parviflora* через 10 и 60 мин экстракции.

ощем рецепторе. Синтезированные производные азулена, азуленилпиперазины, также имеют сродство к гистаминовым и дофаминовым рецепторам клеток животных [22]. Следует отметить, что гистамин образуется в живых клетках при неблагоприятных условиях, в частности под влиянием озона, его обнаружили непосредственно в листьях эвкалипта пепельного [5]. Присутствие азуленов в поверхностных клетках исследованных образцов в этом случае может выполнять защитную функцию. Как нами указано выше, подобная же роль известна и для фенольных соединений, присутствующих во всех растениях в разных количествах.

Рассматривая возможное защитное действие азуленов на поверхности исследованных растений от токсичного влияния озона и образуемых активных форм кислорода, надо подчеркнуть, что древесные виды, представленные в работе, обогащены сесквитерпеновыми лактонами, проазуленами, которые легко превращаются в азулены [11, 14]. Роль азуленов в защитных реакциях растений пока еще мало исследована, в отличие от общеизвестной функции фенольных соединений. В модельных экспериментах показано токсичное действие азулена на жизнедеятельность дафний [23]. Защитный эффект природных и модифицированных азуленов в медицине как фотосенсоров рассматривается в фотодинамической терапии, где они вызывают антифунгальный, бактерицидный и противовирусный эффекты [19]. В данный момент в литературе описана защитная антиоксидантная активность эфирных масел, содержащих природные азулены ромашки, полыни, тысячелистника [24]. Во всех случаях механизм действия азуленов в отношении активных форм кислорода рассматривается с позиции антиоксидантных возможностей основной азуленовой структуры.

Хотя в этой статье мы использовали только электрический разряд для получения озона, но в предыдущей работе [6] отмечены похожие изменения под влиянием ультрафиолетового излучения у масляных желез эвкалипта (выцветание и снижение флуоресценции). При этом уровень выделяемого озона был сопоставим с данными, полученными нами под влиянием электрического разряда. Следует поэтому отметить роль азуленов как оптического фильтра, поглощающего избыток УФ-радиации и света в видимой области. Эти стрессовые факторы при высокой интенсивности солнечного излучения могут усиливать негативное действие озона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чувствительность к озону поверхностных клеток растений может объясняться присутствием в клеточной стенке пигментов азуленов, которые

как мощные антиоксиданты могут быть сенсорами для озона. У рассмотренных древесных видов они предположительно препятствуют и распространению активных форм кислорода с поверхности внутрь клеток. Это может определять устойчивость данных растений к озону, а присутствие азуленов на их поверхности быть тестом на толерантность к исследованному загрязнителю воздуха.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнялась в рамках государственной программы фундаментальных научных исследований (ГП 14) по теме (проекту) 61.3. (0191-2019-0022), регистрационный номер НИОКТР: АААА-А20-120101390067-0.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ernst D., Jürgensen M., Bahnweg G., Heller W., Müller-Starck G. 2012. Common links of molecular biology with biochemistry and physiology in plants under ozone and pathogen attack. In: *Growth and Defense in Plants*. Eds. Matyssek R., Schnyder H., Oßwald W. Heidelberg, New York: Springer, p. 29–51.
- Pearson M. 1995. Effects of ozone on growth and gas exchange of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tree Physiology*. **15** (3), 207–210.
- Pell E.J., Schlagnhauer C.D., Arteca R.N. 2006. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* **100** (2), 264–273.
- Roshchina V.V., Roshchina V.D. 2003. *Ozone and Plant Cell*. Dordrecht: Kluwer. 267 p.
- Roshchina V.V. 2020. How tropospheric ozone influences the allelopathy of woody species: Some experimental approaches. *J. Plant Sci.* **8** (4), 71–79.
- Roshchina V.V., Soltani G.A. 2020. Effects of ozone (O<sub>3</sub>) on leaf secretory cell characteristics related to allelopathy of woody plants: Modelling allelopathic interactions. *Allelopathy J.* **51** (2), 209–220.
- Рощина В.В., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К., Кучин А.В., Солтани Г.А., Куньев А.Р. 2021. Чувствительность к озону поверхностных клеток растений как сенсоров. В кн.: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*. Ред. Бережнов А.В., Зинченко В.П. Пушино 24–28 мая 2021. Т. 2, с. 581–587.
- Budantsev A.Yu., Roshchina V.V. 2020. Enzymatic tissue biotests (MAO and AChE biotests) and bioindicators. In: *Macro, Micro, and Nano-Biosensors*. Eds. Rai M., Reshetilov A., Plekhanova Y., Ingle A.P. Cham, Switzerland: Springer Int. Publ. Ag., p. 37–55.
- Monk R.J., Murray F. 1995. The relative tolerance of some *Eucalyptus* species to ozone exposure. *Water Air Soil Pollut.* **85**, 1405–1411.

10. Townsend A.M., Dochinger L. S. 1982. Relative sensitivity of pine species to ozone. *J. Arboriculture*, **8** (7), 186–188.
11. Коновалов Д.А. 1995. Природные азулены. *Растительные ресурсы*. **31** (1), 101–130.
12. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Спиридонов Н.А., Ковалева Л.В. 1995. Азулены – синие пигменты пыльцы. *Доклады РАН*. **340** (5), 715–718.
13. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Яшин В.А., Карнаухов В.Н. 2002. Автофлуоресценция интактных спор хвоща *Equisetum arvense* L. в процессе развития. *Биофизика*. **47** (2), 318–324.
14. Heilbronner E. 1959. Azulenes. In: *Non-benzenoid aromatic compounds*. Ed. Ginsburg D. New York, London: Intersci. Publ. p.171–276.
15. Nakagawa S., Katoh K., Kusumi T., Komura H., Nomoto K., Konno H., Huneck S., Takeda R. 1992. Two azulenes produced by liverwort, *Calypogeia azurea*, during *in vitro* culture. *Phytochemistry*. **31** (5), 1667–1670.
16. Siegel U., Mues R., Dönig R., Eicher Th., Blechschmidt M., Becker H. 1992. Ten azulenes from *Plagiochila longispina* and *Calypogeia azurea*. *Phytochemistry* **31** (5), 1671–1678.
17. Roshchina V.V. 1999. Mechanisms of cell-cell communication. In: *Allelopathy Update*. Ed. Narwal. S.S., Delhi, Calcutta: Oxford and IBH Publ., vol. 2, p.1–25.
18. Muir R.M., Hansch C. 1961. Azulene derivatives as plant growth regulators. *Nature*. **190**, 741–742.
19. Bakun P., Czarzynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. 2021. *In vitro* and *in vivo* biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med. Chem. Res* **30**, 834–846.
20. Shoji T., Okujima T., Ito S. 2020. Development of heterocycle-substituted and fused azulenes in the last decade (2010–2020). *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7087–7092.
21. Рощина В.В., Яшин В.А., Вихлянцев И.М. 2011. Флуоресценция растительных микроспор как биосенсоров. *Биол. мембраны*. **28** (6), 547–556.
22. Löber S., Hübner H., Buschauer A., Sanna F., Argiolas A., Melis M.R., Gmeiner P. 2012. Novel azulene derivatives for the treatment of erectile dysfunction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 7151–7154.
23. Sweet L.I., Meier P.G. 1997. Lethal and sublethal effects of azulene and longifolene to microtox R *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, and *Pimephales promelas*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 268–274.
24. Sizova N.V. 2012. Composition and antioxidant activity of essential oils containing azulene derivatives. *Pharm. Chem. J.* **46**(6), 369–371.

## The Presence of Azulene on the Surface of Plant Cells As a Test for Ozone Sensitivity

V. V. Roshchina<sup>1, \*</sup>, A. V. Kuchin<sup>1</sup>, A. R. Kunyev<sup>1</sup>, G. A. Soltani<sup>2</sup>,  
L. M. Khaibulaeva<sup>1</sup>, N. K. Prizova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS,  
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

<sup>2</sup>*National Park, Arboretum, Sochi, 354002 Russia*

\*e-mail: roshchinavic@mail.ru

The reactions to ozone of the surface cells of leaves and needles of five introduced wood species of Sochi National Park in chronic exposure for 3 days in total doses of up to 0.05 µl/L have been studied. In secretory structures of silver leaves *Eucalyptus cinerea* F. Muell. Ex. Benth in the cells we observed noticeable changes in absorbance and autofluorescence. Blue and silver-like needles of *Picea pungens* Engelm species. cv. Argentea, *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière cv. Argentea, *Pinus parviflora* Siebold & Zucc. cv. Glauca, and *Acacia dealbata* Link. leaves were not sensitive to ozone in above-mentioned reactions. It was shown that the surface layers of the cuticle and cell wall of these plants included azulenes. These pigments can be primary targets for ozone, and their antioxidant properties determine low sensitivity to ozone.

**Keywords:** absorbance, azulene, cell wall, cuticle, fluorescence, ozone, secretory cells

УДК 612.816.7

## НЕКАНОНИЧЕСКОЕ ПОТЕНЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КАННАБИНОИДОВ АНАНДАМИДА И 2-АРАХИДОНОИЛ-ГЛИЦЕРИНА НА ВЫЗВАННУЮ КВАНТОВУЮ СЕКРЕЦИЮ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

© 2022 г. Е. О. Тарасова<sup>а</sup>, Н. А. Хоткина<sup>а</sup>, П. О. Богачева<sup>а</sup>,  
К. А. Чернышев<sup>а</sup>, А. Е. Гайдуков<sup>а</sup>, \*, О. П. Балезина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2021 г.

После доработки 26.05.2021 г.

Принята к публикации 27.05.2021 г.

Исследовали действие каннабиноидов анандамида (АЭА) и 2-арахидоноил-глицерина (2-АГ) на вызванную стимуляцией нерва быструю синхронную секрецию ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах диафрагмы и мышцы длинного разгибателя пальцев (m. EDL) мыши. С помощью микроэлектродной техники регистрировали спонтанные миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и мультиквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) в ходе коротких ритмических (50 Гц, 1 с) залпов. АЭА (30 мкМ) вызывал увеличение частоты, но не амплитуды МПКП, это сопровождалось возрастанием амплитуды и квантового состава ПКП по всему ходу ритмического залпа. Квантовый анализ показал, что увеличение квантового состава ПКП по ходу залпа в присутствии АЭА происходит за счет возрастания размера пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу. Потенцирующее действие АЭА на вызванную секрецию АХ предотвращалось блокатором  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином, что свидетельствует о растормаживании данного пресинаптического  $Ca^{2+}$ -входа под действием АЭА. 2-АГ (1 мкМ) вызывал значимый прирост амплитуды, но не частоты МПКП в нервно-мышечных синапсах диафрагмы мыши. Одновременно происходило увеличение амплитуды вызванных ПКП по всему ходу залпа, но квантовый состав ПКП при этом оставался на контрольном уровне. Аналогичное потенцирующее действие 2-АГ на амплитуду МПКП и ПКП было выявлено и в моторных синапсах m. EDL. Индуцируемое 2-АГ возрастание амплитуд ПКП предотвращалось ингибитором протеинкиназы А Н-89. В совокупности с ранее полученным нами свидетельством об утрачивании 2-АГ способности увеличивать амплитуду МПКП при ингибировании везикулярного транспорта АХ настоящие результаты позволяют заключить, что в основе механизма потенцирующего действия 2-АГ лежит его способность стимулировать закачку АХ в синаптические везикулы с участием протеинкиназы А, что приводит к увеличению размера квантов АХ. Таким образом, впервые у каннабиноидов 2-АГ и АЭА обнаружена способность оказывать быстро развивающиеся неканонические потенцирующие эффекты на синаптическую передачу в ритмически активных моторных синапсах мыши. Несмотря на сходный характер действия АЭА и 2-АГ – усиление нервно-мышечной передачи, установлено, что эффекты этих эндоканнабиноидов осуществляются посредством запуска различных сигнальных механизмов и предполагают потенцирование разных параметров секреции АХ.

**Ключевые слова:** нервно-мышечный синапс, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, потенциалы концевой пластинки, L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов, размер квантов

**DOI:** 10.31857/S0233475521060128

### ВВЕДЕНИЕ

Эндоканнабиноиды – липофильные производные жирных кислот, вырабатывающиеся в клетках за счет активности определенных липаз [1, 2]. Свою сигнальную функцию эндоканнабиноиды осуществляют, действуя преимущественно на семидоменные G-белок-сцепленные ре-

цепторы двух типов (CB1 и CB2), сопряженные с  $G_i$ -белками [3]. Совокупность эндоканнабиноидов, ферментов их синтеза и метаболизма, а также СВ-рецепторов составляет эндоканнабиноидную систему, наличие компонентов которой в той или иной ткани свидетельствует о ее возможной регуляторной роли в данной структуре [4]. В централь-

ной нервной системе (ЦНС) наиболее известны два эндоканнабиноида: анандамид (АЭА) и 2-арахидоноил-глицерин (2-АГ) [1, 4–6]. Образуясь в постсинаптическом нейроне под действием нейромедиаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом, эндоканнабиноиды, высвобождаясь, действуют на пресинаптические СВ-рецепторы и преимущественно угнетают секрецию нейромедиаторов. Именно поэтому эндоканнабиноиды считаются специфическими сигнализаторами, обеспечивающими каноническое ретроградное торможение синаптической активности [7–10].

В скелетных мышцах и периферических моторных синапсах в настоящее время описаны компоненты эндоканнабиноидной системы [11–14]. Имеются свидетельства аутокринной регуляции метаболизма мышцы с участием эндоканнабиноидов и их рецепторов [14]. Данные о влиянии эндоканнабиноидов на активность моторных синапсов и нервно-мышечную передачу в настоящее время малочисленны и противоречивы. В моторных синапсах холоднокровных животных описано снижение спонтанной и вызванной секреции медиатора при активации СВ1-рецепторов [15–17], что согласуется с каноническим тормозящим действием эндоканнабиноидов в синапсах ЦНС. Совсем недавно были получены свидетельства о способности эндоканнабиноидов и их рецепторов потенцировать спонтанную секрецию АХ в нервно-мышечных синапсах млекопитающих [18–20]. Так, в наших недавних исследованиях было впервые показано, что два классических эндоканнабиноида 2-АГ и АЭА при их экзогенной аппликации оказывают неканоническое потенцирующее влияние на различные параметры спонтанной секреции АХ в моторных синапсах диафрагмы мыши. Активируя одни и те же пресинаптические СВ1-рецепторы, они приводили к запуску разных сигнальных путей и к изменению разных параметров одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП): 2-АГ увеличивал амплитуду МПКП, а АЭА — их частоту [20]. Неизбежно возник вопрос: способны ли данные эндоканнабиноиды оказывать облегчающие синаптическую передачу эффекты и в случае вызванной стимуляцией нерва быстрой синхронной мультиквантовой секреции АХ? В связи с этим целью нашей работы было изучить действие АЭА и 2-АГ на вызванный выброс АХ в условиях кратковременной ритмической залповой активности нервно-мышечных синапсов мыши и провести сравнительный анализ их влияний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Эксперименты были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma* — *n. phrenicus*), а также мышцы длинного раз-

гибателя пальцев ноги (*m. extensor digitorum longus* — *n. peroneus* (*m. EDL*)) взрослых мышей (7–9 недель, весом 25–35 г) линии BALB/c обоих полов. Мыши были получены из лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ (Москва, Россия). И содержание животных (12-часовой цикл света и темноты со свободным доступом к еде и воде), и проведенные экспериментальные процедуры соответствовали директиве 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными и были одобрены комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ. Эвтаназию мышей проводили путем быстрой декапитации. В исследовании было использовано 16 животных.

**Электрофизиология.** Все эксперименты проводили при температуре 20–22°C. Нервно-мышечный препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом или *m. EDL* с малоберцовым нервом помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл и проводили перфузию оксигенированным (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) раствором Лайли (рН 7.2–7.4) [19]. Регистрировали спонтанные МПКП и вызванные стимуляцией нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП). Для исследования вызванной стимуляцией нерва секреции АХ проводили поперечное рассечение мышечных волокон. В результате данной процедуры мембранный потенциал стабилизировался на сниженном по сравнению с нерассеченными волокнами уровне (менее –50 мВ), что предотвращало сокращение мышцы при стимуляции нерва. Сразу после рассечения препарат промывали в растворе Лайли (более 150 мл) не менее 1 ч, что позволяло предотвратить возможную блокаду проведения потенциала действия по нерву. При изучении вызванной активности сначала производили запись МПКП в течении 70–90 с, а затем стимулировали нерв короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 стимулов длительностью 0.08–0.1 мс с частотой 50 Гц) и в том же синапсе регистрировали ПКП. Среднее значение амплитуд МПКП, зарегистрированных до залпа ПКП, затем использовали для вычисления квантового состава ПКП. Ранее было выявлено отсутствие статистически значимых различий в значениях амплитуд МПКП, зарегистрированных до и сразу после залпа [21, 22]. Это позволяет исключить возможное влияние десенситизации постсинаптических никотиновых холинорецепторов в развитии изменений амплитуд и квантового состава ПКП по ходу залпа. Стимуляцию нерва проводили с перерывами не менее 5–6 мин, что предотвращало развитие утомления синапсов или изменения частоты МПКП. Регистрацию постсинаптических потенциалов осуществляли с использованием стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М KCl, сопротивление кончика микроэлектрода составляло 15–20 МОм. Сигна-

лы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) или Axoclamp-2B (Molecular Devices, США). Запись производили с использованием аналого-цифровых преобразователей E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 3.3.8 (ДИСофт, Россия). Первичный анализ параметров постсинаптических потенциалов проводили в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, США). В контроле регистрировали потенциалы минимум от 5 синапсов, затем в перфузионный раствор добавляли исследуемые вещества в определенном порядке и регистрировали активность разных синапсов таким же образом, как и в контроле, в течение 1–1.5 ч. Критерием включения синапса в выборку для дальнейшей обработки служило устойчивое значение мембранного потенциала в течение записи – допускались изменения этого параметра менее чем на 5 мВ, в противном случае регистрацию прекращали, а запись не включали в выборку. Время нарастания МПКП составляло не более 1 мс, а ПКП – не более 1.7 мс. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

**Анализ данных и статистика.** Оценивали амплитуду и временные характеристики МПКП и ПКП, частоту МПКП, квантовый состав ПКП. Амплитуду ПКП корректировали на нелинейную сумму [23], квантовый состав ПКП вычисляли как отношение скорректированной амплитуды ПКП к средней в данном синапсе амплитуде МПКП. Кроме того, при изменении квантового состава ПКП под действием АЭА оценивали размер пула непосредственно готовых к выбросу везикул (Readily Releasable Pool, RRP). Для этого использовали последовательную модель, которая предполагает, что уменьшение квантового состава ПКП в начале залпа отражает непрерывное истощение единого RRP при высокочастотной ритмической активности моторных синапсов. При этом стабилизация амплитуды и квантового состава ПКП на заключительном этапе короткого залпа, выражающаяся в виде фазы плато, возникает за счет рекрутирования в RRP синаптических везикул, компенсируя его истощение [24]. Используя линейную регрессию на начальном этапе депрессии передачи (5–12 ПКП), проводили пересечение с осью абсцисс (кумулятивный квантовый состав в коротком залпе ПКП). ПКП в самом начале залпа, где регистрируется облегчение синаптической передачи, не учитывались при расчете размера RRP. Вероятность выброса квантов АХ рассчитывали как отношение квантового состава первого ПКП в залпе к значению RRP [24, 25].

Статистическую значимость различий между сравниваемыми выборками оценивали с использованием GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, США). Тест Д’Агостино–Пирсона применяли для оценки

нормальности распределения значений параметров. В случае нормально распределенных величин применяли *t*-критерий Стьюдента, в случае распределения, отличного от нормального, – критерий Манна–Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони использовали для анализа амплитуд и квантового состава ПКП в залпе. Различия параметров выборок считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ ,  $n$  – количество исследованных синапсов в выборке. В тексте и на рисунках данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

**Материалы.** В экспериментах были использованы: эндоканнабиноиды АЭА и 2-АГ, блокатор потенциалзависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа – нитрендипин и ингибитор протеинкиназы А – Н-89 (Tocris Bioscience, Великобритания). Для приготовления стоковых растворов для всех веществ, кроме Н-89, в качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (DMSO, Хеликон, Россия), растворителем для Н-89 служила деионизированная вода. Концентрация DMSO в рабочих растворах не превышала 0.01% по объему, растворитель не оказывал самостоятельного действия на исследуемые параметры.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов исследовали влияние АЭА (30 мкМ) на вызванную секрецию АХ в нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши. Оказалось, что в контроле среднее значение частоты МПКП, измеренное в синапсах до начала ритмической стимуляции нерва, составило  $0.42 \pm 0.05$  Гц ( $n = 16$ ), а на фоне действия АЭА данный параметр статистически значимо увеличивался до  $0.67 \pm 0.08$  Гц ( $n = 24$ ,  $p < 0.05$ ). Это совпадает с описанным в нашей предыдущей работе сдвигом данного параметра МПКП на фоне действия АЭА в нервно-мышечных препаратах с нерассеченными мышечными волокнами [20]. Регистрация вызванной активности моторных синапсов мыши выявила, что в присутствии АЭА происходит значительное возрастание амплитуды каждого ПКП в залпе, начиная с первого, в среднем на 70% по сравнению с контролем, при этом форма залпа ПКП не менялась (рис. 1а). Возрастание амплитуд ПКП под действием АЭА не сопровождалось увеличением амплитуд МПКП, а происходило вследствие возрастания квантового состава ПКП. Квантовый состав первого ПКП в залпе увеличивался приблизительно на 60% по сравнению с контролем, и далее данный прирост стойко сохранялся на повышенном уровне на протяжении всего ритмического залпа (рис. 1б). Анализ изменений квантового состава показал, что усиление вызванной секреции АХ на

фоне АЭА связано с возрастанием пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу (RRP) — от  $712.5 \pm 60.0$  в контроле до  $1015.1 \pm 66.1$  при действии АЭА ( $p < 0.05$ ). При этом не происходило статистически значимого увеличения вероятности выброса везикул — среднее значение этого параметра составило  $0.037 \pm 0.003$  в контроле и  $0.042 \pm 0.002$  при действии АЭА ( $p > 0.05$ ) (рис. 1б). Такая совокупность изменений параметров быстрой синхронной квантовой секреции АХ свидетельствует о вовлечении в секрецию АХ ранее молчавших активных зон нервных терминалей, что вызывает равномерное увеличение квантового состава и амплитуд ПКП по всему ходу залпа [24, 25].

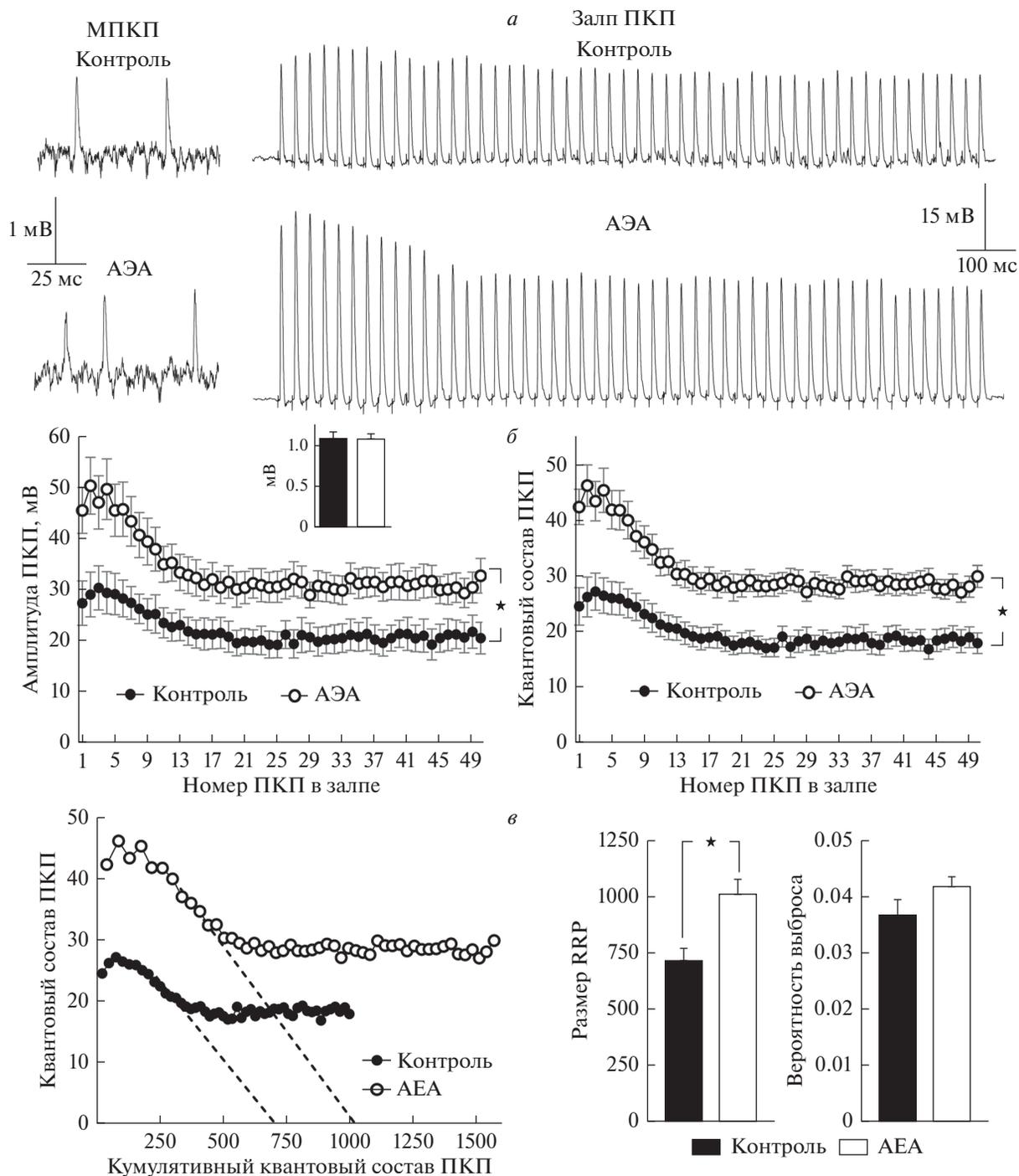
В предыдущих работах мы наблюдали аналогичную картину потенцирования вызванной секреции АХ в виде единообразного симметричного прироста амплитуд и квантового состава ПКП по всем ходу залпа. Это происходило в ответ на релаксацию обычно молчащих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа различными способами: при блокаде кальций-активируемых  $\text{K}^+$ -каналов BK-типа [26, 27], ингибировании кальциейрина [28], блокировании  $\text{A}_1$ -рецепторов или активации  $\text{A}_{2A}$ -рецепторов аденозина [21], стимуляции P2X7-пуринорецепторов [25]. Иными словами, единообразный прирост амплитуд и квантового состава всех ПКП в коротком ритмическом залпе может, на наш взгляд, служить характерным маркером, свидетельствующим о вовлечении в регуляцию вызванной секреции АХ  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Эти потенциалзависимые каналы хоть и присутствуют на пресинаптической мембране моторных нервных окончаний, но в обычных условиях не участвуют в запуске быстрого синхронного выброса квантов АХ [29–31].

Совсем недавно мы установили, что постепенное возрастание частоты МПКП под действием АЭА может быть связано с активацией именно пресинаптических  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа, поскольку такое возрастание предотвращалось нитрендипином — блокатором этого типа каналов [20]. В связи с этим, в данной работе мы также проводили блокаду  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа при помощи нитрендипина (1 мкМ) и исследовали на этом фоне действие АЭА. Оказалось, что нитрендипин, сам по себе не влияя на амплитуду и квантовый состав ПКП в залпах [21, 28], полностью предотвращал возрастание этих параметров быстрой синхронной секреции квантов АХ под действием АЭА (рис. 2). Таким образом, блокирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа нитрендипином способно предотвратить не только АЭА-индуцированное усиление спонтанной секреции АХ в моторных синапсах мышцы в виде увеличения частоты МПКП:  $0.44 \pm 0.06$  Гц в контроле ( $n = 15$ ),  $0.46 \pm 0.07$  Гц на фоне действия АЭА в присутствии нитрендипина ( $n = 19$ ,  $p > 0.05$ ), но и потен-

цирование вызванной секреции АХ, проявляющаяся в виде стойкого прироста квантового состава ПКП и их амплитуды.

Полученные результаты позволяют предполагать, что АЭА оказывает в моторных синапсах мышцы пресинаптическое облегчающее действие на вызванную секрецию АХ в виде увеличения амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу ритмических залпов. Мы впервые показали, что такое потенцирующее действие АЭА связано, видимо, с активацией потенциалзависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и входом по ним кальция. Мы также впервые установили, что механизм такого облегчающего действия на вызванную активность моторных синапсов с участием L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов предполагает вовлечение в секрецию АХ ранее молчавших активных зон и возрастанием размера пула синаптических везикул, непосредственно готовых к высвобождению (RRP). Такой же механизм был отмечен нами ранее и в случаях потенцирования квантового состава ПКП с участием L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов при их релаксации путем активации пресинаптических P2X7-пуринорецепторов [25].

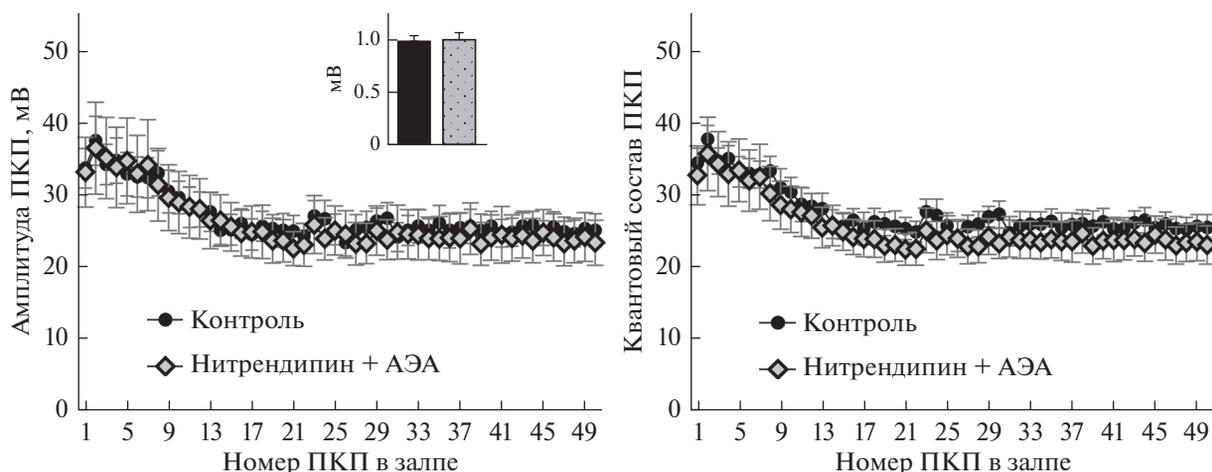
Ранее нами было показано, что пресинаптическое влияние АЭА на спонтанную секрецию АХ с участием L-типа  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов предотвращается блокированием СВ1-типа рецепторов [20]. Это позволяет нам предполагать, что и в случае с вызванной секрецией АХ эффекты АЭА реализуются через активацию СВ1-рецепторов, однако это требует отдельной проверки с использованием блокатора СВ1-рецепторов. Согласно классическим представлениям, в синапсах ЦНС эндоканнабиноиды, действуя на пресинаптические СВ1-рецепторы, сопряженные с  $\text{G}_i$ -белками, угнетают активность аденилатциклазы и протеинкиназы А (РКА) и тормозят функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов N- или P/Q-типов. Это главный механизм реализации канонического ретроградного торможения синаптической передачи с участием эндоканнабиноидов [4, 9, 10]. В нашей работе в моторных синапсах впервые обнаружен неканонический — потенцирующий эффект АЭА в отношении основного способа нервно-мышечной передачи — быстрой синхронной мультиквантовой секреции АХ. Наши данные позволяют предполагать, что механизм такого неканонического действия АЭА заключается в его возможном действии на пресинаптические СВ1-рецепторы, что в конечном итоге приводит к развитию потенциации спонтанной и вызванной секреции АХ посредством облегчения дополнительного пресинаптического входа  $\text{Ca}^{2+}$  по  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа и увеличения, за счет этого, размера пула готовых к высвобождению везикул АХ в нервных терминалях синапсов за счет рекрутирования в этот пул ранее молчавших активных зон и их везикул.



**Рис. 1.** АЭА усиливает вызванную стимуляцией нерва синаптическую передачу в моторных синапсах диафрагмы. Ре- презентативные записи МПКП (слева) и короткого высокочастотного залпа ПКП (справа) в контроле и на фоне дей- ствия 30 мкМ АЭА (а). Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу залпа в контроле ( $n = 16$ ) и под действием АЭА ( $n = 24$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне АЭА (б). Графики квантового состава ПКП по ходу залпа в зависимости от кумулятивного квантового состава ПКП в контроле и под действием АЭА. Пересечение с осью X, экстраполированное из начальной фазы депрессии, отражает размер пула ве- зикул, непосредственно готовых к выбросу (RRP). АЭА вызывает увеличение размера RRP, но не вероятности выбро- са квантов АХ (в). ★ –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Во второй части работы мы исследовали дей- ствие другого эндоканнабиноида 2-АГ (1 мкМ) на вызванную секрецию АХ в нервно-мышечных си-

напсах диафрагмы мыши в течение коротких вы- сокочастотных залпов синаптической активнос- ти. 2-АГ вызывал прирост амплитуды МПКП на



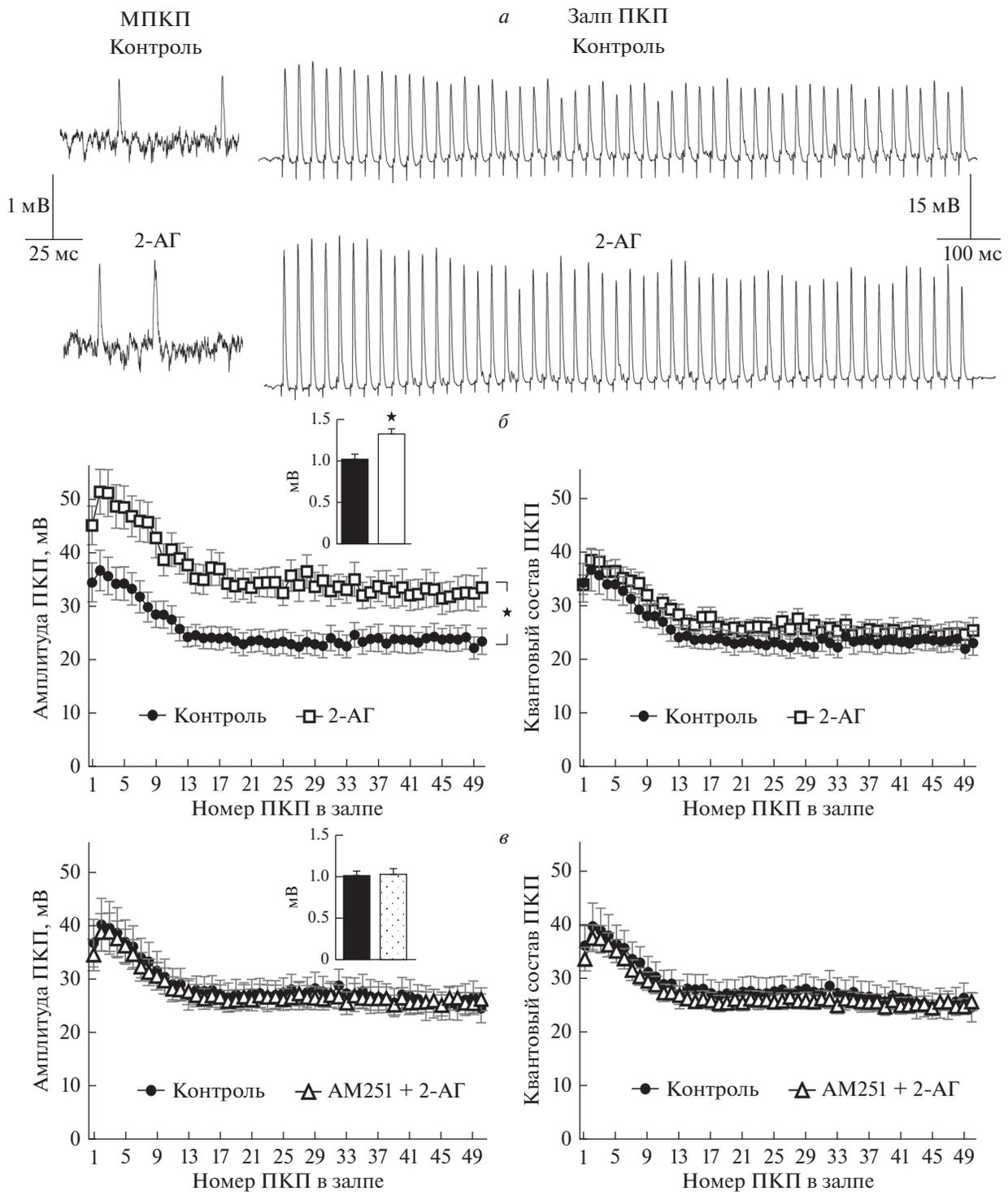
**Рис. 2.** АЭА-индуцированное потенцирование быстрой синхронной секреции квантов АХ, вызванной стимуляцией нерва в моторных синапсах диафрагмы, происходит за счет демаскирования потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа. Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП по ходу залпа (справа) в контроле ( $n = 15$ ) и под действием 30 мкМ АЭА в присутствии 1 мкМ блокатора кальциевых каналов L-типа нитрендипина ( $n = 19$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне АЭА в присутствии нитрендипина.

треть по сравнению с контролем (рис. 3а, 3б). При этом данный эндоканнабиноид не влиял на частоту спонтанного выброса АХ – среднее значение этого параметра МПКП составило  $0.57 \pm 0.09$  Гц в контроле ( $n = 16$ ) и  $0.58 \pm 0.05$  Гц под действием 2-АГ ( $n = 20$ ,  $p > 0.05$ ). Такие изменения в присутствии 2-АГ параметров МПКП, зарегистрированные в моторных синапсах перед их ритмической стимуляцией, совпадают с описанными нами ранее потенцирующими эффектами 2-АГ в отношении спонтанной секреции АХ в моторных синапсах мыши в препаратах с интактными мышечными волокнами. Нами также было показано, что действие 2-АГ на параметры спонтанной секреции АХ реализуются при активации СВ1-типа рецепторов [20].

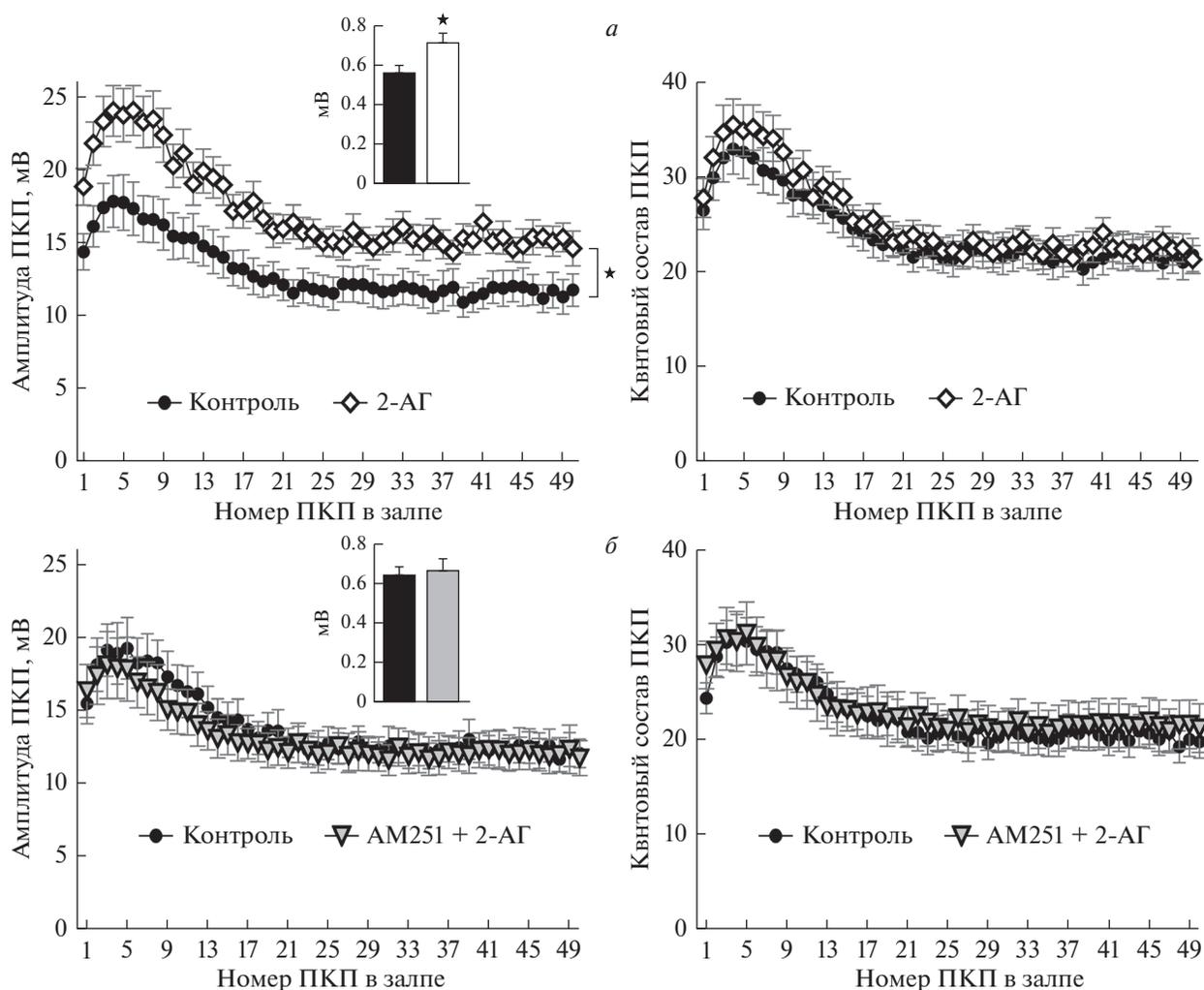
Что касается вызванной стимуляцией нерва мультиквантовой секреции АХ, то на фоне 2-АГ, как и при действии АЭА, происходил значительный прирост амплитуд ПКП по всему ходу залпа примерно на 40% по сравнению с контролем (рис. 3а, 3б). Однако, в отличие от действия АЭА, такое 2-АГ-индуцированное увеличение амплитуд ПКП не сопровождалось возрастанием их квантового состава, поскольку происходило параллельное увеличение амплитуд, соответствующих одноквантовых МПКП (рис. 3б). Таким образом, усиление вызванной активности нервно-мышечных синапсов на фоне 2-АГ в виде возрастания амплитуд ПКП в залпе связано, видимо, с увеличением размера отдельных квантов АХ в составе мультиквантовых ПКП. В присутствии блокатора СВ1-рецепторов AM251 (1 мкМ) 2-АГ утрачивал способность увеличивать амплитуду постсинаптических потенциалов (рис. 3в), что позволяет предположить, что 2-АГ реализует свое

потенцирующее действие в отношении размера квантов АХ, специфически активируя пресинаптические СВ1-рецепторы и запуская, таким образом, сигнальный каскад, направленный на стимуляцию транспорта АХ в везикулы. Аналогичный эффект 2-АГ был получен нами и в нервно-мышечных синапсах *m. EDL*. В присутствии 2-АГ (1 мкМ) в моторных синапсах этой мышцы также наблюдалось выраженное увеличение амплитуды МПКП по сравнению с контролем (рис. 4). Как и в нервно-мышечных препаратах диафрагмы, вызванное 2-АГ возрастание амплитуды МПКП не сопровождалось изменениями частоты спонтанной секреции АХ: в контроле значение этого параметра МПКП составило  $0.40 \pm 0.06$  Гц ( $n = 19$ ), а в присутствии 2-АГ –  $0.45 \pm 0.05$  Гц ( $n = 24$ ,  $p > 0.05$ ). Под действием 2-АГ аналогично тому, что происходило в моторных синапсах диафрагмы мыши, в синапсах *m. EDL* было зарегистрировано увеличение амплитуд ПКП по всему ходу короткого высокочастотного залпа при неизменном уровне квантового состава ПКП (рис. 4а). Блокирование СВ1-рецепторов AM251 (1 мкМ) в синапсах *m. EDL*, как и в диафрагмальных синапсах, эффективно предотвращало 2АГ-индуцируемое увеличение амплитуд спонтанных и вызванных постсинаптических потенциалов (рис. 4б). Полученный результат однозначно свидетельствует об облегчающем СВ1-опосредованном действии 2-АГ на нервно-мышечную передачу вне зависимости от типа исследуемой мышцы.

Очевидно, что в основе потенцирования вызванной секреции АХ под действием 2-АГ лежит иной механизм, чем при действии АЭА. Если в случае с АЭА усиление нервно-мышечной передачи реализуется за счет количества синхронно



**Рис. 3.** 2-АГ усиливает вызванную стимуляцией нерва синаптическую передачу в моторных синапсах диафрагмы. Репрезентативные записи МПКП (слева) и короткого высокочастотного залпа ПКП (справа) в контроле и на фоне действия 1 мкМ 2-АГ (а). Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу залпа в контроле ( $n = 16$ ) и под действием 2-АГ ( $n = 20$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне 2-АГ (б). Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу залпа в контроле ( $n = 18$ ) и под действием 2-АГ в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов AM251 (1 мкМ) ( $n = 29$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне 2-АГ в присутствии AM251 (в). ★ –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

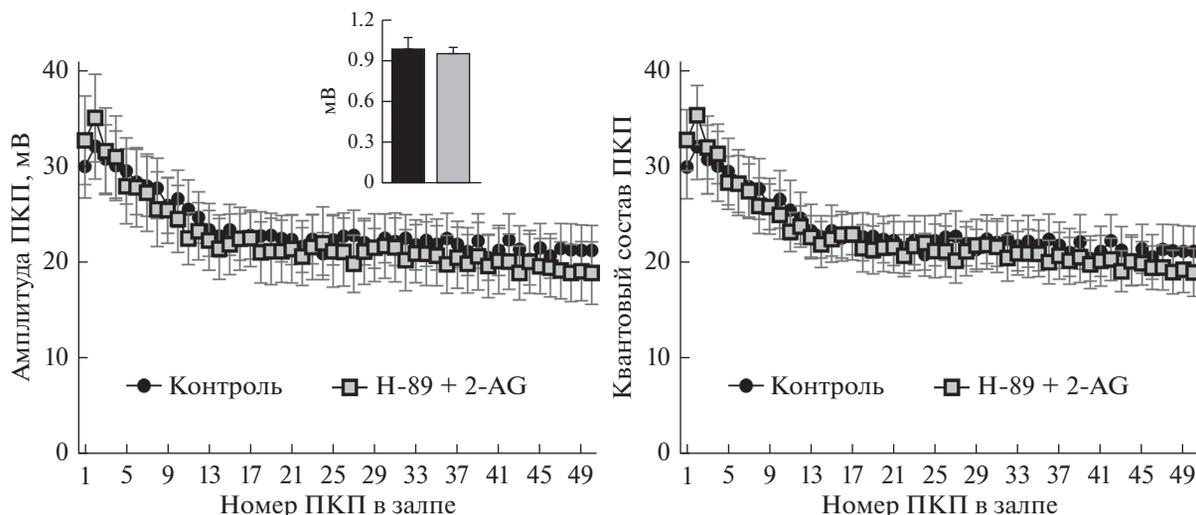


**Рис. 4.** 2-АГ усиливает вызванную стимуляцией нерва синаптическую передачу в моторных синапсах длинного разгибателя пальцев (m. EDL). Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу залпа в контроле ( $n = 19$ ) и под действием 1 мкМ 2-АГ ( $n = 22$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне 2-АГ (а). Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу залпа в контроле ( $n = 18$ ) и под действием 2-АГ в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов АМ251 (1 мкМ) ( $n = 20$ ). На врезке – средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне 2-АГ в присутствии АМ251 (б).  $\star - p < 0.05$  по сравнению с контролем.

секретируемых квантов АХ в ответ на стимуляцию нерва, то в случае 2-АГ количество выбрасываемых в ответ на нервный импульс из терминали квантов остается неизменным, но увеличивается размер каждого одиночного кванта АХ. В подтверждение этому в нашей предыдущей работе было выявлено, что прирост амплитуд МПКП, зарегистрированных на нерасщепленных нервно-мышечных препаратах диафрагмы при действии 2-АГ, полностью предотвращается ингибированием везикулярного транспортера АХ везамиком (1 мкМ) [20]. Таким образом, наблюдаемый на фоне 2-АГ прирост амплитуды как МПКП, так и ПКП при регистрации вызванной активности моторных синапсов является, по-видимому, следствием усиления транспорта АХ в синаптические везикулы, т.е. обусловлен изменением про-

цессов, протекающих на пресинаптическом уровне. Совсем недавно в условиях длительного воздействия синтетического агониста СВ-рецепторов на моторные синапсы мышцы была выявлена принципиальная возможность каннабиноид-индуцированного увеличения размера квантов АХ [18].

Известно, что усиление работы везикулярного транспортера АХ в моторных синапсах может быть связано с пресинаптической активностью РКА [32–34]. Действительно, для СВ-рецепторов была показана возможность функциональной сцепки с  $G_s$ -белками, которые при активации СВ-рецепторов стимулируют активность аденилатциклазы, что приводит к увеличению уровня сАМР в терминали и возрастанию активности РКА [35, 36]. В связи с этим требовалось экспериментально проверить предположение, что сиг-



**Рис. 5.** 2-АГ-индуцированное увеличение амплитуд МПКП и ПКП, вызванных стимуляцией нерва в моторных синапсах диафрагмы, требует участия РКА. Изменение амплитуды (слева) и квантового состава ПКП по ходу залпа (справа) в контроле ( $n = 15$ ) и под действием 1 мкМ 2-АГ в присутствии 1 мкМ ингибитора РКА Н-89 ( $n = 20$ ). На врезке — средняя амплитуда МПКП в контроле и на фоне 2-АГ в присутствии Н-89.

нальный путь, запускаемый действием 2-АГ в моторных синапсах мыши, может приводить к активации РКА и тем самым в конечном итоге к усилению везикулярного транспорта и увеличению размера одиночных квантов АХ.

Для проверки данного предположения мы исследовали влияние 2-АГ на секрецию АХ в нервно-мышечных синапсах на фоне ингибитора РКА — Н-89 (1 мкМ). Сам по себе Н-89 не оказывает влияния на параметры ни спонтанной, ни вызванной нервно-мышечной активности [21, 33, 34]. Однако в присутствии Н-89 2-АГ утрачивал способность увеличивать амплитуды постсинаптических потенциалов как спонтанных МПКП, так ПКП в коротких высокочастотных залпах (рис. 5). Тем самым мы показали, что увеличение размера кванта АХ, обусловленное действием 2-АГ, действительно происходит с участием РКА.

Суммируя представленные в данной работе результаты, можно заключить, что нами впервые получены сведения о возможности неканонического потенцирующего действия не только на спонтанную (в покое), но и на вызванную секрецию АХ при ритмической залповой активности синапсов двух классических эндогенных каннабиноидов, АЭА и 2-АГ. Мы показали, что оба эндоканнабиноида способны потенцировать вызванный выброс АХ, действуя пресинаптически (и, вероятнее всего, через одни и те же СВ1-рецепторы). При этом облегчение нервно-мышечной передачи в случае действия АЭА и 2-АГ проявляется через потенцирование разных параметров секреции АХ (возрастание квантового состава ПКП или размеров квантов АХ, соответственно) и реализацию принципиально разных механиз-

мов с вовлечением, по всей видимости, разных сигнальных каскадов.

В настоящее время происходит пересмотр классических представлений об однозначных и традиционно тормозных эффектах каннабиноидов даже в синапсах ЦНС. Способность эндоканнабиноидов оказывать облегчающее действие на вызванную секрецию медиаторов хоть и считается примером их неканонической активности, но подкрепляется в последнее время все большим числом свидетельств [37–41]. Обсуждается возможность сопряжения эндоканнабиноидных рецепторов не только с  $G_i$ -, но и  $G_q$ -, а также  $G_s$ -типами G-белков. Так, в определенных синапсах ЦНС стимуляция СВ1-рецепторов увеличивает уровень сАМР, что является (хотя и непрямым) доказательством активации эндоканнабиноидами  $G_s$ -белков, приводящей к развитию неканонических эффектов [35, 36].

Показано также, что активация одного и того же типа пресинаптических СВ1-рецепторов разными синтетическими агонистами или эндогенными лигандами, такими как АЭА или 2-АГ, может сопровождаться запуском множества сигнальных каскадов [42–44]. Это явление, получившее название смещенного агонизма, выражается в виде развития широкого спектра модулирующих эффектов в синапсах [18–20, 44]. Функциональное разнообразие последствий активации СВ-рецепторов в настоящее время объясняется наличием разных конформационных состояний рецепторов, имеющих потенциальное сродство к разным G-белкам. От того, какой агонист действует на СВ-рецептор, зависит стабилизация этого рецептора в конформационном состоянии,

обеспечивающим активацию G-белков с определенного составом субъединиц и последующим запуском сигнальных путей, причем не обязательно тормозящих секрецию медиатора [45, 46]. Кроме смещенного агонизма при анализе синаптических эффектов эндоканнабиноидов необходимо учитывать возможность запуска G-белок-независимых сигнальных путей за счет рекрутирования к СВ-рецепторам  $\beta$ -аррестинов с последующей активацией сигнальных каскадов с участием митоген-активируемых протеинкиназ или системы аденилатциклаза/сАМР, что может приводить к вариабельным функциональным последствиям [45, 47, 48].

Подобное разнообразие эффектов эндоканнабиноидов и механизмов их реализации также было выявлено и в нашей работе.

Является ли обнаруженное нами неканоническое острое облегчающее действие двух классических эндоканнабиноидов на вызванную квантовую секрецию АХ следствием их избирательной активности именно в периферических моторных синапсах, или же оно отражает специфику тонического экзогенного действия этих сигнальных молекул, отличную от эффектов эндоканнабиноидов, выделяющихся в моторных синапсах эндогенно при определенных режимах их функционирования, — вопросы, которые предстоит выяснить в дальнейших специальных исследованиях.

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

**Источники финансирования.** Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-00616а.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nicolussi S., Gertsch J. 2015. Endocannabinoid transport revisited. *Vitam. Horm.* **98**, 441–485. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.011>
- Silver R.J. 2019. The Endocannabinoid system of animals. *Animals*. **9**, 686. <https://doi.org/10.3390/ani9090686>
- Zou S., Kumar U. 2018. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>
- Cristino L., Bisogno T., Di Marzo V. 2020. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 9–29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 1995. 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 89–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>
- Chevalere V., Takahashi K.A., Castillo P.E. 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 37–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834>
- Kreitzer A.C., Regehr W.G. 2002. Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 324–330. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00328-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00328-8)
- Lovinger D.M. 2008. Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* **184**, 435–477. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2_14)
- Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimoto-dani Y., Uchigashima M., Watanabe M. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **89**, 309–380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
- Castillo P.E., Younts T.J., Chávez A.E., Hashimoto-dani Y. 2012. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. **76**, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>
- Cavuto P., McAinch A.J., Hatzinikolas G., Janovská A., Game P., Wittert G.A. 2007. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.099>
- Crespillo A., Suárez J., Bermúdez-Silva F.J., Rivera P., Vida M., Alonso M., Palomino A., Lucena M., Serrano A., Pérez-Martín M., Macías M., Fernández-Llóbreges P., Rodríguez de Fonseca F. 2011. Expression of the cannabinoid system in muscle: Effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem. J.* **433**, 175–185. <https://doi.org/10.1042/BJ20100751>
- Hutchins-Wiese H.L., Li Y., Hannon K., Watkins B.A. 2012. Hind limb suspension and long-chain omega-3 PUFA increase mRNA endocannabinoid system levels in skeletal muscle. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.005>
- Maccarrone M., Bab I., Bíró T., Cabral G.A., Dey S.K., Di Marzo V., Konje J.C., Kunos G., Mechoulam R., Pachter P., Sharkey K.A., Zimmer A. 2015. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>
- Van der Kloot W. 1994. Anandamide, a naturally-occurring agonist of the cannabinoid receptor, blocks adenylyl cyclase at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.* **649**, 181–184. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91062-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91062-6)
- Sánchez-Pastor E., Trujillo X., Huerta M., Andrade F. 2007. Effects of cannabinoids on synaptic transmission in the frog neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 439–445. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.116319>
- Silveira P.E., Silveira N.A., de Cássia Morini V., Kushmerick C., Naves L.A. 2010. Opposing effects of cannabinoids and vanilloids on evoked quantal release at the frog neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.* **473**, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.02.026>

18. Morsch M., Protti D.A., Cheng D., Braet F., Chung R.S., Reddel S.W., Phillips W.D. 2018. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission. *Sci. Rep.* **8**, 4685. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22888-4>
19. Gaydukov A.E., Dzhalogoniya I.Z., Tarasova E.O., Balezina O.P. 2020. The participation of endocannabinoid receptors in the regulation of spontaneous synaptic activity at neuromuscular junctions of mice. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* **14**, 7–16. <https://doi.org/10.1134/S1990747819060059>
20. Тарасова Е.О., Хоткина Н.А., Гайдуков А.Е., Балежина О.П. 2021. Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мыши под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида. *Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология.* **76**, 3–9.
21. Tarasova, E.O., Miteva A.S., Gaidukov A.E., Balezina O.P. 2015. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* **9**, 318–328. <https://doi.org/10.1134/S1990747815050141>
22. Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Balezina O.P. 2019. The participation of presynaptic alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the inhibition of acetylcholine release during long-term activity of mouse motor synapses. *Neurochem. J.* **13**, 20–27. <https://doi.org/10.1134/s1819712419010082>
23. McLachlan E.M., Martin A.R. 1981. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol.* **311**, 307–324. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013586>
24. 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**, 2000–2008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
25. Miteva A.S., Gaydukov A.E., Shestopalov V.I., Balezina O.P. 2018. Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pan-nexin 1 knockout mice. *Purin. Signal.* **14**, 459–469. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9630-7>
26. Gaydukov A.E., Melnikova S.N., Balezina O.P. 2009. Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels. *Bull. Exp. Biol. Med.* **148**, 163–166. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0678-9>
27. Tarasova E.O., Gaydukov A.E., Balezina O.P. 2015. Methods of activation and the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of acetylcholine secretion in the motor synapses of mice. *Neurochem. J.* **9**, 101–107. <https://doi.org/10.1134/S1819712415020099>
28. Gaydukov A.E., Tarasova E.O., Balezina O.P. 2013. Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice. *Neurochem. J.* **7**, 29–33. <https://doi.org/10.1134/S1819712413010030>
29. Urbano F.J., Depetris R.S., Uchitel O.D. 2001. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflügers Arch.* **441**, 824–831. <https://doi.org/10.1007/s004240000489>
30. Flink M.T., Atchison W.D. 2003. Iberiotoxin-induced block of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 646–652. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.046102>
31. Pagani R., Song M., McEneaney M., Qin N., Tsien R.W., Toro L., Stefani E., Uchitel O.D. 2004. Differential expression of alpha 1 and beta subunits of voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca<sup>2+</sup> channel knockout mouse. *Neuroscience*, **123**, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.019>
32. Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Balezina O.P. 2016. Calcitonin gene-related peptide increases acetylcholine quantal size in neuromuscular junctions of mice. *Neurosci. Lett.* **628**, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.014>
33. Van Der Kloot W., Benjamin W.B., Balezina O.P. 1998. Calcitonin gene-related peptide acts presynaptically to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. *J. Physiol.* **507**, 689–695. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.689bs.x>
34. Gaydukov A.E., Bogacheva P.O., Tarasova E.O., Molchanova A.I., Miteva A.S., Pravdivceva E.S., Balezina O.P. 2019. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses. *Cells*, **8**, 762. <https://doi.org/10.3390/cells8070762>
35. Glass M., Felder C.C. 1997. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: Evidence for a G(s) linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.* **17**, 5327–5333. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-14-05327.1997>
36. Abadji V., Lucas-Lenard J.M., Chin C.N., Kendall D.A. 1999. Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of G(s). *J. Neurochem.* **72**, 2032–2038. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0722032.x>
37. Xu J.Y., Zhang J., Chen C. 2012. Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via endocannabinoids. *J. Physiol.* **590**, 2305–2315. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223511>
38. Cui Y., Prokin I., Xu H., Delord B., Genet S., Venance L., Berry H. 2016. Endocannabinoid dynamics gate spike-timing dependent depression and potentiation. *ELife*, **5**, e13185. <https://doi.org/10.7554/eLife.13185>
39. Silva-Cruz A., Carlström M., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. 2017. Dual influence of endocannabinoids on long-term potentiation of synaptic transmission. *Front. Pharmacol.* **8**, 921. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00921>
40. Augustin S.M., Lovinger D.M. 2018. Functional relevance of endocannabinoid-dependent synaptic plasticity in the central nervous system *ACS Chem. Neurosci.* **9**,

- 2146–2161.  
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00508>
41. Piette C., Cui Y., Gervasi N., Venance L. 2020. Lights on endocannabinoid-mediated synaptic potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 132.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00132>
42. Varga E., Georgieva T., Tumati S., Alves I., Salamon Z., Tollin G., Yamamura H.I., Roeske W.R. 2008. Functional selectivity in cannabinoid signaling. *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 273–284.  
<https://doi.org/10.2174/1874467210801030273>
43. Laprairie R.B., Bagher A.M., Kelly M.E.M., Dupré D.J., Denovan-Wright, E.M. 2014. Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *J. Biol. Chem.* **289**, 24845–24862.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557025>
44. Diez-Alarcia R., Ibarra-Lecue I., Lopez-Cardona Á.P., Meana J., Gutierrez-Adán A., Callado L.F., Agirregoitia E., Urigüen L. 2016. Biased agonism of three different cannabinoid receptor agonists in mouse brain cortex. *Front. Pharmacol.* **7**, 415.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00415>
45. Finlay D.B., Cawston E.E., Grimsey N.L., Hunter M.R., Korde A., Vemuri V.K., Makruiannis A., Glass M. 2017. G $\alpha$ s signalling of the CB1 receptor and the influence of receptor number. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2545–2562.  
<https://doi.org/10.1111/bph.13866>
46. Di Marzo V. 2018. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 623–639.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2018.115>
47. Ibsen M.S., Connor M., Glass M. 2017. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2**, 48–60.  
<https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>
48. Morales P., Bruix M., Jiménez M.A. 2020. Structural insights into  $\beta$ -arrestin/cb1 receptor interaction: Nmr and cd studies on model peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–18.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21218111>

## Noncanonical Potentiation of Acetylcholine Evoked Quantal Release Induced by Cannabinoids Anandamide- and 2-Arachidonolglycerole in Mouse Motor Synapses

E. O. Tarasova<sup>1</sup>, N. A. Khotkina<sup>1</sup>, P. O. Bogacheva<sup>1</sup>, K. A. Chernyshev<sup>1</sup>,  
 A. E. Gaydukov<sup>1</sup>\*, O. P. Balezina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Department, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: [gaydukov@gmail.com](mailto:gaydukov@gmail.com)

We studied the effects of the endocannabinoids anandamide (AEA) and 2-arachidonolglycerol (2-AG) on the evoked activity of mouse diaphragm and extensor *digitorum longus* (*m. EDL*) neuromuscular junctions (NMJs). Using the microelectrode technique, spontaneous miniature endplate potentials (MEPPs) and multi-quantal endplate potentials (EPPs) evoked by short rhythmic nerve stimulation trains (50 Hz, 1 s) were recorded. AEA (30  $\mu$ M) caused an increase in the MEPP frequency but not in MEPP amplitude, which leads to an increase in amplitude and quantal content (QC) of each EPP in a train. Quantal analysis showed that AEA causes an enlargement of the size of the readily releasable pool of vesicles in motor terminals. The AEA-induced increase in EPP amplitude and QC was prevented by L-type Ca<sup>2+</sup>-channel blocker nitrendipine (1  $\mu$ M), which suggests that this channel type is upregulated upon the AEA application. 2-AG (1  $\mu$ M) caused an increase in MEPP amplitude but not in their frequency in mouse diaphragm NMJs. This was accompanied by an increase in the EPP amplitude, whereas their QC remained at the control level. The same effect was reproduced in synapses of *m. EDL*. The rise of the EPP amplitude caused by 2-AG was prevented by PKA inhibition by H89 (1  $\mu$ M). These data, together with previous evidence that blocking vesicular transport of acetylcholine (ACh) abolishes the 2-AG-induced increase in MEPP amplitude, allows us to suggest that 2-AG stimulates ACh pumping into vesicles in a PKA-dependent way, thus causing an increase in the size of a single ACh quanta. This work is the first to show a fast noncanonical facilitating action of AEA and 2-AG on evoked mouse NMJ activity. AEA and 2-AG cause similar presynaptic and CB1-receptor-dependent changes of neuromuscular transmission, but they exert their effects through two different ways, leading to facilitation of different parameters of ACh secretion.

**Keywords:** neuromuscular junction, anandamide, 2-arachidonol glycerol, endplate potentials, L-type Ca<sup>2+</sup> channels, quantal size

УДК 576.31

## ИНДУКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦИКЛОСПОРИН-ЗАВИСИМОЙ ПОРЫ АЦИЛКАРНИТИНАМИ. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ДЛИНЫ УГЛЕРОДНОЙ ЦЕПИ

© 2022 г. Н. И. Федотчева<sup>а</sup>, Е. В. Гришина<sup>а</sup>, В. В. Дынник<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: Dynn timer@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.04.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принята к публикации 02.06.2021 г.

Известно, что концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) при ожирении и диабете сильно увеличиваются, а в условиях ишемии-реперфузии могут превышать десятки мкМ в очаге поражения клеток. Наиболее токсичными считаются LCAC, активированные производные LCFA. В данной работе исследовано влияние *D,L*-ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на индукцию митохондриальной циклоспорин А (CsA)-зависимой поры (mPTP). В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс тестировали гексаилоилкарнитин (НС, С6:0), лауроилкарнитин (LC, С12:0), миристоилкарнитин (МС, С14:0) и пальмитоилкарнитин (РС, С16:0); регистрировали скорость дыхания митохондрий, митохондриальный потенциал ( $\Delta\Psi$ ) и набухание митохондрий при окислении глутамата и пирувата в присутствии ацилкарнитинов в различных концентрациях. Показано, что все исследованные ацилкарнитины вызывают ингибирование дыхания митохондрий, активированного ADP-гексокиназной системой, а также индуцируют набухание митохондрий. Величины наблюдаемых эффектов обратно пропорциональны длине углеродной цепи ацилкарнитинов. Критические концентрации РС, МС, LC и НС, при которых происходит снижение  $\Delta\Psi$ , составляют 100, 110, 500 мкМ и 3 мМ соответственно. Индукция набухания митохондрий происходит при пороговых концентрациях РС, МС и LC 10, 25 и 200 мкМ соответственно. CsA, EGTA и ADP увеличивают пороговые концентрации РС и МС, необходимые для индукции mPTP, и не эффективны при более высоких концентрациях ацилкарнитинов. Таким образом, в ряду карнитиновых производных насыщенных жирных кислот с длиной углеродной цепи от 6 до 16 РС и МС являются наиболее токсичными агентами, способными вызывать индукцию mPTP.

**Ключевые слова:** ацилкарнитины, митохондриальная пора

**DOI:** 10.31857/S0233475522010066

### ВВЕДЕНИЕ

Концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в плазме крови используются как маркеры ряда врожденных метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также диабета 2 типа (T2D) и стеатогепатита и др. [1, 2]. При ожирении и T2D, распространение которых в мире носит характер пандемии, риск возникновения инсульта/инфаркта увеличивается в несколько раз. Увеличение такого риска может быть обусловлено токсическим действием LCFA и LCAC, вызывающим нарушение  $Ca^{2+}$ -гомеостаза и гибель клеток по типу некроза или апоптоза.

Концентрации LCFA и LCAC в крови пациентов с ожирением и T2D в 2–4 раза превышают контрольные величины [1], а в условиях ишемии-

реперфузии в очаге поражения клеток могут превышать десятки мкМ [3–5]. LCAC – основная активированная форма LCFA, которая переносится кровью, транспортируется в митохондрии и окисляется в виде Ацил-КоА. Длинноцепочечные Ацил-КоА являются ингибиторами NAD-зависимых дегидрогеназ, включая ферменты цикла Кребса и глутаматдегидрогеназу [6], а также транслокатора адениннуклеотидов (ANT) и других митохондриальных транспортеров [7–11].

Хорошо известно, что LCFA вызывают разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий [12], стимулируют индукцию избытком  $Ca^{2+}$  циклоспорин А (CsA)-чувствительной митохондриальной поры (mPTP) [13–15]. Принято считать, что индукция mPTP играет важную роль в гибели клеток по типу некроза, апоптоза или

некроптоза [13–16]. Кальций является основным индуктором этой поры. Избыточное накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях приводит к обратимому или необратимому открытию поры, деполяризации и деэнергизации митохондрий и индукции mPTP.

Исследования последних лет показывают, что LCAC и соответствующие Ацил-КоА накапливаются в постишемических митохондриях в больших концентрациях [9]. Очевидно, что длинноцепочечные Ацил-КоА могут быть основными токсинами, вызывающими подавление энергетики митохондрий и индукцию mPTP, вследствие ингибирования ими ключевых дегидрогеназ митохондрий и различных транспортеров [6–11]. Однако к настоящему времени механизмы токсического действия LCFA, LCAC, и Ацил-КоА на регуляцию  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза, энергетику митохондрий и индукцию mPTP в клетках разных типов изучены недостаточно. Мало исследован также вопрос о сравнительном действии ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на индукцию CsA-зависимой поры, который и составляет предмет данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выделения митохондрий и проведения экспериментов описаны ранее [17]. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар (возраст 6–8 недель) содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20–22°C (свет/темнота – 12 ч/12 ч). Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA и 10 мМ трис-НСl (рН 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала: 125 мМ КCl, 3 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Скорость потребления кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 1 мл, при 27°C и постоянном перемешивании. Разность электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония ( $\text{TPP}^+$ ), концентрацию которого во внешней среде  $[\text{TPP}^+]_{\text{out}}$  регистрировали с

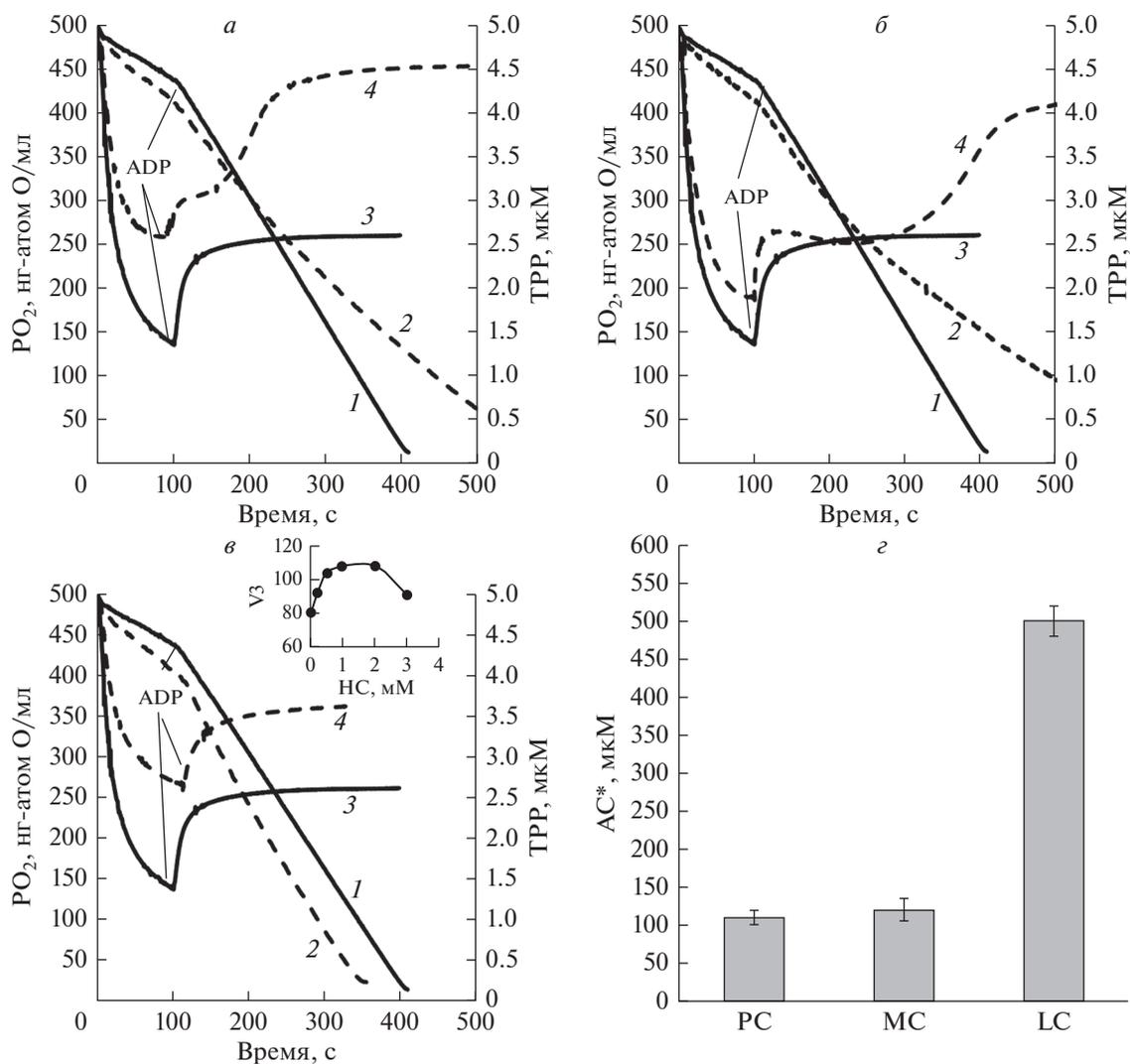
помощью  $\text{TPP}^+$ -селективного электрода. Среда инкубации содержала 125 мМ КCl, 3 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 2 мкМ  $\text{TPP}^+$ . Стационарную скорость дыхания в состоянии V3 при добавлении 750 мкМ ADP обеспечивали внесением в среду инкубации 5 мМ глюкозы и 0.5 ед. гексокиназы. В работе использовали реактивы фирм Sigma-Aldrich (США), Tocris (Великобритания).

Набухание митохондрий определяли спектральным методом при длине волны 540 нм с использованием спектрофотометра Ocean Optic USB-4000 (США). Митохондрии (0.3–0.4 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 125 мМ КCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7.4), в качестве субстратов окисления использовали глутамат (10 мМ) с пируватом (1 мМ) или сукцинат (5 мМ).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с t-критерия Стьюдента для сравнения пар величин с помощью программы SigmaPlot 11. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  S.E.M. Количество повторенных независимых экспериментов  $n = 4–6$ . За уровень значимости принято  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние ацилкарнитинов на дыхание митохондрий и митохондриальный потенциал.** Рис. 1 характеризует влияние ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи (C6, C12–C16) на дыхание митохондрий и митохондриальный потенциал  $\Delta\psi$  при активации энергетики митохондрий ADP-гексокиназной системой. Преинкубация митохондрий с 100 мкМ *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC, C16:0) вызывает ингибирование дыхания и быструю диссипацию  $\Delta\psi$ , которые наблюдаются после добавки ADP и активации дыхания митохондрий (скорость дыхания V3) (рис. 1а). Диссипация  $\Delta\psi$  и деэнергизация митохондрий, так же как и набухание митохондрий (см. ниже), свидетельствуют об открытии mPTP при избытке PC. Средняя пороговая концентрация PC (для *D,L*-формы) составляет 110 мкМ (рис. 1б). При меньших концентрациях PC ( $[\text{PC}] < 60–70$  мкМ) сброс потенциала и открытие поры развиваются медленно. Сходный эффект вызывает миристилкарнитин (MC, C14:0), для которого пороговая концентрация составляет 120 мкМ (рис. 1б). В сравнении с PC и MC, лауроилкарнитин (LC, C12:0) вызывает ингибирование дыхания и сброс  $\Delta\psi$  только при концентрациях, превышающих 500 мкМ (рис. 1б). Короткоцепочечный гексаоилкарнитин (HC, C6:0) активирует дыхание и не вызывает сброс  $\Delta\psi$  даже при концентрации в 2 мМ (рис. 1в). Слабое ингибирование дыхания митохондрий наблюдается только при больших концентрациях HC, превышающих 3 мМ (рис. 1в, вставка). Это ингибирование



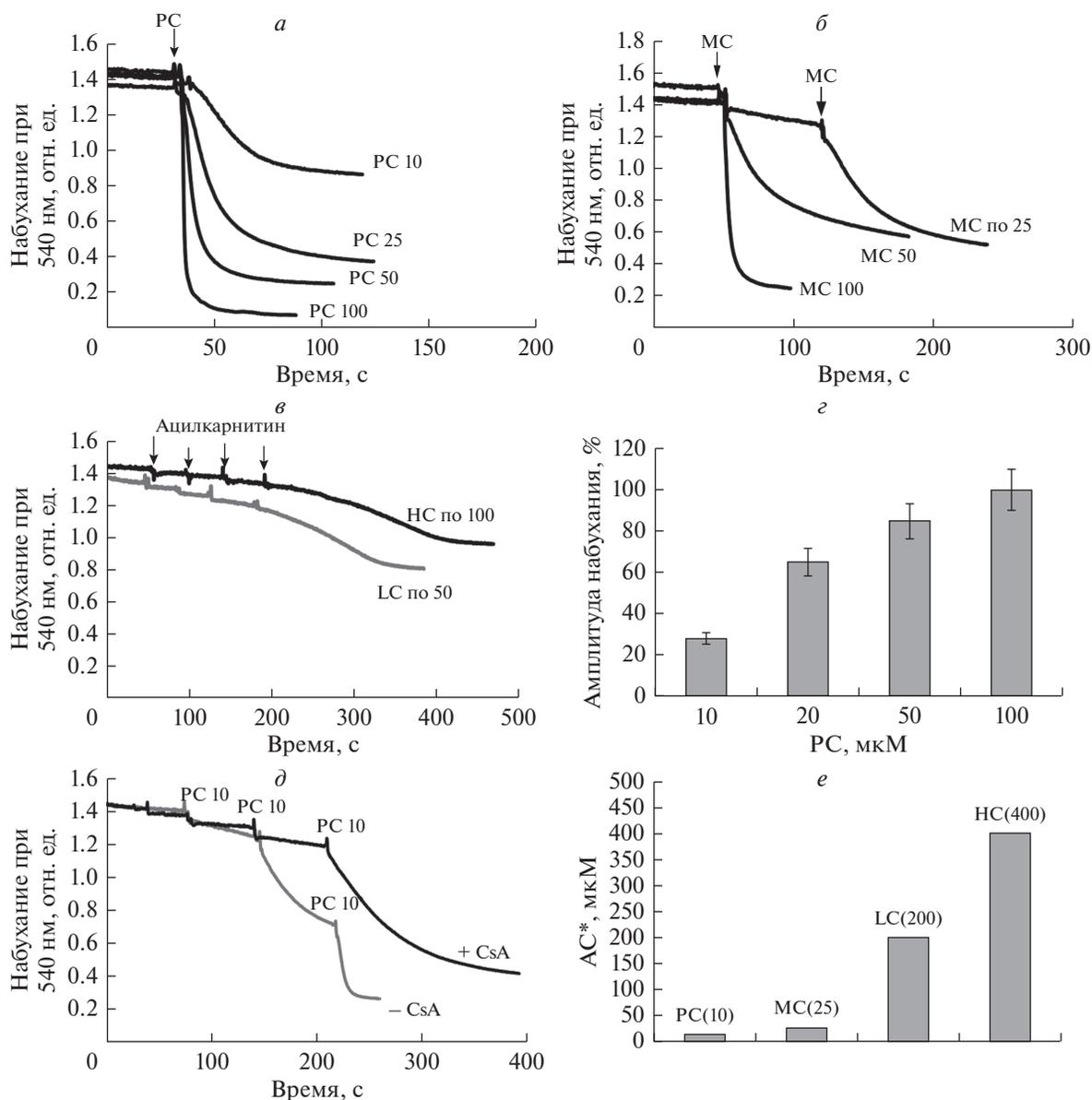
**Рис. 1.** Влияние ацилкарнитинов с различной длиной углеродной цепи на дыхание и мембранный потенциал митохондрий.

*а* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1 мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 110 мкМ пальмитоилкарнитина (PC, 2, 4). *б* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1 мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 450 мкМ лауроилкарнитина (LC, 2, 4). *в* – Дыхание (1, 2) и мембранный потенциал (3, 4) митохондрий регистрировали в присутствии 1 мМ ADP, глюкозы и гексокиназы в контроле (1, 3) и при преинкубации митохондрий с 2,0 мМ гексаноилкарнитина (HC, 2, 4). *г* – Пороговые концентрации ацилкарнитинов (AC\*), при которых происходит сброс мембранного потенциала (выход TPP из митохондрий). MC – миристоилкарнитин. Все ацилкарнитины в *D,L*-форме. V<sub>3</sub> – скорость дыхания митохондрий (нг-атом О/мл/мин).

ние снимается при добавках малата или сукцината в среду инкубации (не показано), что указывает на возможное ингибирование дегидрогеназ цикла Кребса короткоцепочечными Ацил-КоА. Ранее нами было показано, что подобный эффект обратимого ингибирования энергетики митохондрий может наблюдаться даже при избытке пирувата [14].

**Влияние ацилкарнитинов на набухание митохондрий.** На рис. 2 представлены данные о влиянии концентраций ацилкарнитинов (C6, C12–C16) на набухание митохондрий. Видно, что PC (рис. 2а)

и MC (рис. 2б) обладают сходным токсическим действием. При разовых добавках в 25 и 50 мкМ соответственно, PC и MC индуцируют 50–60% набухание митохондрий, а при концентрациях 100 мкМ оба ацилкарнитина индуцируют быстрое 100% набухание митохондрий. Зависимость амплитуды набухания от концентрации PC показана на рис. 2г. В сравнении с действием длинноцепочечных ацилкарнитинов, эффекты карнитинов с более короткой длиной углеродной цепи LC (C12:0) и HC (C6:0) выражены слабо. Видно, что 25–30% набухание митохондрий развивается

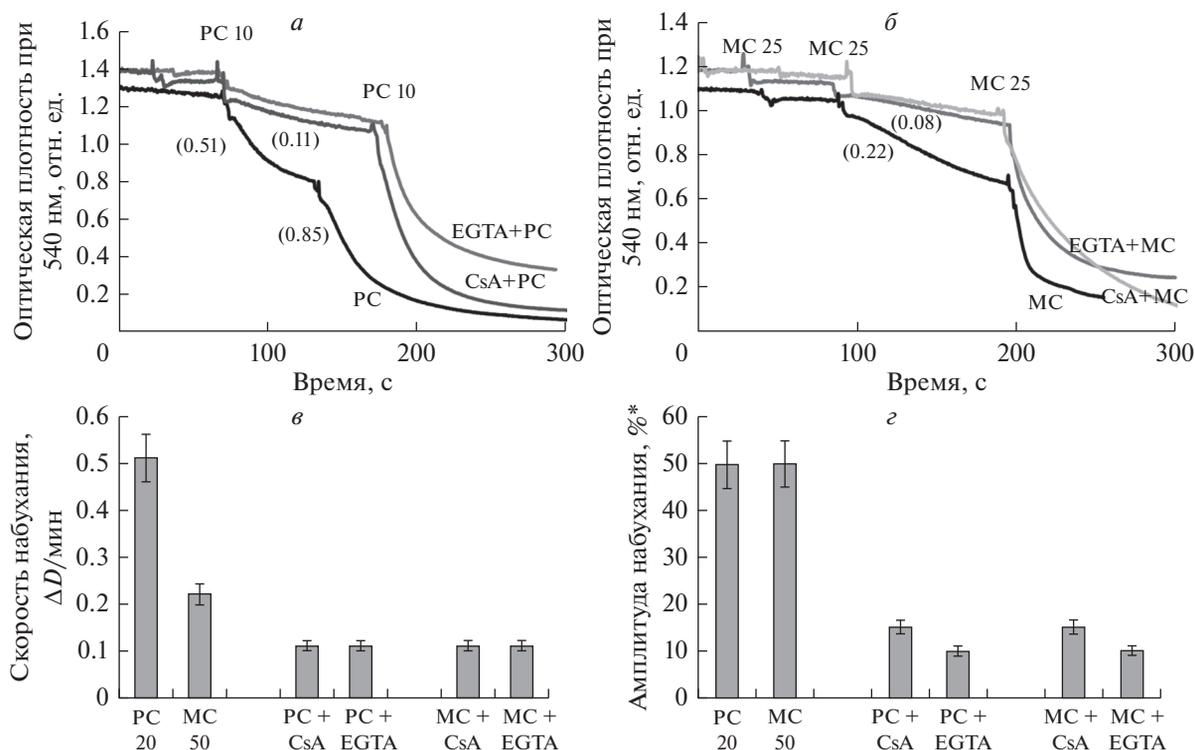


**Рис. 2.** Набухание митохондрий, индуцированное ацилкарнитинами с различной длиной углеродной цепи. *a* – Набухание митохондрий, индуцированное пальмитоилкарнитином в разных концентрациях (PC). *б* – Набухание митохондрий, индуцированное миристоилкарнитином (MC) в разных концентрациях. *в* – Набухание митохондрий при последовательных добавках лауроилкарнитина (LC) и гексаилоилкарнитина (HC). *г* – зависимость амплитуды набухания митохондрий от концентрации PC при окислении глутамата с пируватом; *д* – индуцированное PC набухание митохондрий при окислении сукцината и влияние циклоспорина А; *е* – пороговые концентрации (значения указаны в скобках) ацилкарнитинов (AC\*), индуцирующие набухание митохондрий. В качестве субстратов окисления были использованы глутамат 10 мМ + пируват 1 мМ и сукцинат (5 мМ), концентрация митохондриального белка 0.3–0.4 мг/мл, среда инкубации 120 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1.5 мМ фосфата, pH 7.4.

только при достижении концентраций LC и HC, превышающих 200 и 400 мкМ соответственно (рис. 2в).

Влияние последовательных малых добавок PC и MC на набухание митохондрий показано на рис. 3. Однократные добавки 10 мкМ PC и 25 мкМ MC не вызывают заметный эффект, тогда как последующие добавки индуцируют быстрое набуха-

ние митохондрий (контроль, рис. 3а, 3б, нижние кривые). Набухание митохондрий при однократных добавках 10 мкМ PC (рис. 3а) и 25 мкМ MC (рис. 3б) эффективно предотвращается CsA и EGTA (рис. 3а, 3б, верхние кривые), тогда как вторая добавка PC и третья добавка MC вызывают 100% набухание митохондрий, что указывает на ограниченный защитный эффект CsA и EGTA,



**Рис. 3.** Влияние циклоспорина А и EGTA на индуцированное ацилкарнитинами набухание митохондрий. Набухание митохондрий, индуцированное последовательными добавками пальмитоилкарнитина (PC), 10 мкМ каждая (а), и мристоилкарнитинном (MC), 25 мкМ каждая добавка (б), в присутствии циклоспорина А (2 мкМ) и EGTA (1 мМ); в скобках указаны скорости набухания ( $\Delta D/\text{мин}$ ). Ингибирование скорости (в) и амплитуды (г) индуцированного 20 мкМ PC и 50 мкМ MC набухания митохондрий циклоспоринном А и EGTA. \* – за 100% принята максимальная амплитуда набухания, наблюдаемая в присутствии 100 мкМ PC. Субстраты окисления глутамат (10 мМ) и пируват (1 мМ).

наблюдающийся при пороговых концентрациях LCAC.

Влияние CsA и EGTA на скорости и амплитуды набухания митохондрий при действии 20 мкМ PC и 50 мкМ MC представлена на рис. 3в, 3г соответственно. Из данных, представленных на этих рисунках следует, что только при концентрациях PC и MC близких к пороговым величинам 20 мкМ и 50 мкМ, CsA и EGTA оказывают характерный для CsA-зависимой поры (mPTP) защитный эффект. Защитный эффект отсутствует при более высоких концентрациях PC и MC (рис. 3а, 3б).

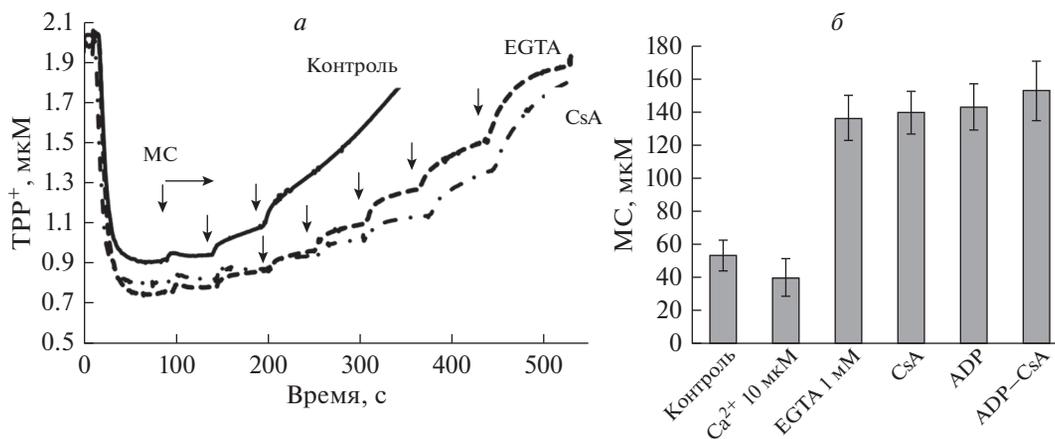
**Влияние мристоилкарнитина на диссипацию митохондриального потенциала. Ограниченный защитный эффект CsA и EGTA.** Из данных приведенных на рис. 4а видно, что в контроле (верхняя кривая) третья добавка 20 мкМ MC вызывает снижение митохондриального потенциала  $\Delta\Psi$ . Преинкубация митохондрий с CsA или EGTA препятствует индукции поры при таких условиях, тогда как последующие добавки MC вызывают концентрационно-зависимую диссипацию  $\Delta\Psi$ , указывая на ограниченный защитный эффект этих ингибиторов. Известно, что ADP,  $\text{Mg}^{2+}$ , ингибиторы ANT (карбоксиаттрактолизид, бонгкреко-

вая кислота) и др. также ингибируют индукцию mPTP, вызванную ионами кальция [16]. При индукции поры PC или MC также наблюдается защитный эффект этих соединений. Из рис. 3б следует, что пороговая концентрация MC (MC\*), вызывающая диссипацию  $\Delta\Psi$  увеличивается более чем в 2 раза в присутствии CsA, EGTA, ADP ( $\text{ADP} + \text{Mg}^{2+} + \text{гексокиназа}$ ) или при сочетанном действии CsA и EGTA, тогда как наличие  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации усиливает действие MC, снижая пороговую величину MC\*. Взаимное синергичное действие PC и  $\text{Ca}^{2+}$  при индукции mPTP нами было показано ранее на митохондриях печени и сердца [18, 19].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что длинноцепочечные LCAC (MC и PC) можно рассматривать, как наиболее токсичные агенты в ряду производных насыщенных жирных кислот, вызывающих индукцию CsA-зависимой поры.

Хорошо известно, что CsA, адениновые нуклеотиды (ATP, ADP), ингибиторы ANT и  $\text{Mg}^{2+}$



**Рис. 4.** Влияние циклоспорина А и EGTA на индуцированное ацилкарнитинами снижение мембранного потенциала митохондрий. Изменения мембранного потенциала, индуцированные последовательными добавками миристоилкарнитина (МС), 20 мкМ каждая добавка в присутствии 2 мкМ CsA и 1 мМ EGTA (а); влияние Ca<sup>2+</sup> и ингибиторов митохондриальной поры (EGTA 1 мМ, CsA 2 мкМ и ADP 0.7 мМ) на пороговые концентрации миристоилкарнитина (б).

препятствуют индукции mPTP кальцием [16], а эффект неорганического фосфата (P<sub>i</sub>) дозозависим [20, 21]. Механизмы регуляции и структурные элементы этого белкового мегакомплекса остаются предметом споров в течение нескольких десятков лет [13–16]. В настоящее время считается, что этот мегаканал формируется с участием АТФ-синтазы (F1F0), ANT, переносчика фосфата P<sub>i</sub> (PiC) и ключевого регулятора поры циклофилина D (CypD) [16]. CypD и F1F0 являются мишенями CsA [16, 22].

В наших экспериментах CsA и ADP вызывают увеличение пороговой концентрации МС (МС\*), необходимой для диссипации ΔΨ (рис. 4б). Однако, в отличие от классической модели индукции открытия поры избытком Ca<sup>2+</sup>, при индукции поры LCAC защитный эффект CsA ограничен концентрациями PC или MC, близкими к пороговым. Из рис. 3 видно, что CsA эффективен только при малых концентрациях PC и MC. Уже вторая добавка 10 мкМ PC или 25 мкМ MC вызывает быстрое набухание митохондрий. Эти данные могут свидетельствовать о наличии разных мишеней в мегакомплексе поры, на которые может быть направлено действие Ca<sup>2+</sup> и LCAC и соответствующих ацил-КоА.

CypD рассматривается в качестве ключевой мишени CsA при индукции mPTP кальцием [16, 22]. Одной из наиболее вероятных мишеней действия LCAC, а также соответствующих ацил-КоА, при индукции mPTP может быть ANT. Известно, что цитоплазматические и митохондриальные длинноцепочечные ацил-КоА, связываясь с ANT, вызывают ингибирование этого переносчика аденилатов [9–11]. Поэтому, известная гипотеза об участии LCFA и их производных в стабилизации ANT в цитоплазматической или митохон-

дриальной конформациях и роли таких конформационных переходов в регуляции mPTP [23] требует дальнейшего изучения.

Известно, что LCFA могут вызывать образование липидной поры [24–26]. Длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты: пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и эйкозановая (C20:0) кислоты, имеющие, в сравнении с другими LCFA, высокое сродство к Ca<sup>2+</sup>, могут образовывать в мембранах разного типа липидную пору. Образование такой обратимой липидной поры (комплекса жирной кислоты и Ca<sup>2+</sup>) предотвращается в присутствии EGTA [25, 26]. Теоретически можно было бы допустить, что деацетилирование пальмитоил-КоА и миристоил-КоА в митохондриях в условиях наших экспериментов может приводить к локальному накоплению соответствующих жирных кислот и индукции липидной поры. Однако индукция поры с участием MC в наших условиях наблюдается в присутствии EGTA и CsA (рис. 4б), что свидетельствует об участии LCAC в регуляции классической CsA-зависимой mPTP.

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

**Источники финансирования.** Работа выполнена в рамках Государственного контракта 075-00381-21-00 Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН).

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, сформулированными в Хельсинкской декларации по использованию лабораторных животных. Все процедуры на животных были одобрены комитетом по этике ИТЭБ РАН (N28 / 2021, 9 февраля 2021 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D., Muoio D.M. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7** (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
- Fromenty B., Robin M.A., Igoudjil A., Mansouri A., Pessayre D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* **30** (2), 121–138. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70098-8](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70098-8)
- Ford D.A., Han X., Horner C.C., Gross W. 1996. Gross accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: Metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry.* **35** (24), 7903–7909. <https://doi.org/10.1021/bi960552n>
- Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B., Kerner J., Hoppel C.L. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33** (6), 1065–1089. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1378>
- Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Volska K., Kuka J., Makarova E., Antone U., Sevostjanovs E., Vilskersts R., Strods A., Tars K., Dambrova M. 2016. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem. J.* **473** (9), 1191–1202. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160164>
- Erfle J.D., Sauer F. 1969. The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and alpha-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **178** (3), 441–452. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90213-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90213-7)
- Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* **16** (7), 795–803.
- Farrell H.M.Jr., Wickham E.D., Reeves H.C. 1995. Effects of long-chain acyl-coenzyme A's on the activity of the soluble form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* **321** (1), 199–208. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1386>
- Paulson D.J., Shug A.L. 1984. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **766** (1), 70–76. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90218-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90218-4)
- Schoenfeld P., Bohnensack R. 1997. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett.* **420**, 167–170.
- Ciapaite J., Van Eikenhorst D., Bakker S., Diamant M., Heine R.J., Wagner M.J., Westerhoff H.V., Krab K. 2005. Modular kinetic analysis of the adenine nucleotide translocator-mediated effects of palmitoyl-CoA on the oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Diabetes.* **54** (4), 944–951. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.944>
- Wojtczak L., Wieckowski M.R. 1999. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 447–455.
- Hunter D.R., Haworth R.A. 1979. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch. Biochem. Biophys.* **195** (2), 468–477.
- Crompton M., Ellinger H., Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357–360.
- Bernardi P., Broekemeir K.M., Pfeiffer D.R. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5), 509–517. <https://doi.org/10.1007/BF00762735>
- Kwong J.Q., Molkentin J.D. 2015. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* **21** (2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>
- Гришина Е.В., Галимова М.Х., Джафаров Р.Х., Сергеев А.С., Федотчева Н.И., Дынник В.В. 2015. Индукция циклоспорин-чувствительной митохондриальной поры субстратами, образующими ацетил-CoA, в норме и при диабете 2 типа. *Биол. мембраны.* **32** (5–6), 319–327. <https://doi.org/10.7868/S0233475515050047>
- Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Nenov M.N., Kasyrov V.A., Pimenov O.Y., Dynnik V.V. 2020. Dissecting cellular mechanisms of long-chain acylcarnitines-driven cardiotoxicity: Disturbance of calcium homeostasis, activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipases, and mitochondrial energetics collapse. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (20), 7461. <https://doi.org/10.3390/ijms21207461>
- Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2020. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* **287** (8), 1525–1536. <https://doi.org/10.1111/febs.15090>
- Chalmers S., Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278** (2), 19062–19070.
- Mishra J., Ariea J., Davani L., Gayathri K., Natarajan K., Kwok W.M., David F., Stowe J., Camara A.K.S. 2019. Cyclosporin A increases mitochondrial buffering of calcium: An additional mechanism in delaying mitochondrial permeability transition pore opening. *Cells.* **8**, 1052. <https://doi.org/10.3390/cells8091052>
- Fayaz S.M., Raj Y.V., Krishnamurthy R.G. 2015. Cy-pD: The key to the death door. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **14**, 654–663.
- Zoratti M., Szabo I. 1995. Mitochondrial permeability pore. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 139–176.

24. Sultan A., Sokolove P.M. 2001. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **386** (1), 37–51.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2194>
25. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey C., Louisot P., Saris N.E. 2001. Palmitic and stearic acids bind  $\text{Ca}^{2+}$  with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to  $\text{Ca}^{2+}$ -activated mitochondrial pores. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33** (4), 319–331.  
<https://doi.org/10.1023/a:1010659323937>
26. Mironova G.D., Pavlov E.V. 2021. Mitochondrial cyclosporine A-independent palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced permeability transition pore (PA-mPT Pore) and its role in mitochondrial function and protection against calcium overload and glutamate toxicity. *Cells.* **10**, 125.  
<https://doi.org/10.3390/cells10010125>

## Induction of Mitochondrial Cyclosporin-dependent Permeability Transition Pore by Acylcarnitines. Effects of Concentrations and Carbon Chain Length

N. I. Fedotcheva<sup>1</sup>, E. V. Grishina<sup>1</sup>, V. V. Dynnik<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

\**e-mail: Dynnik@rambler.ru*

It is known that the concentrations of long-chain fatty acids (LCFA) and their carnitine derivatives (LCAC) in the blood at obesity and type 2 diabetes are greatly increased and under conditions of ischemia/reperfusion can exceed tens of  $\mu\text{M}$  in the area of cell damage (for example, in stroke/heart attack). The most toxic are LCAC, activated derivatives of LCFA. In this work we investigated effects of *D,L*-acylcarnitines with different carbon chain lengths (hexanoylcarnitine (HC, C6: 0); lauroylcarnitine (LC, C12: 0); myristoylcarnitine (MC, C14: 0), and palmitoylcarnitine (PC, C16: 0)) on the induction of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). In experiments on isolated rat liver mitochondria, the mitochondrial respiration rate ( $V_3$  and  $V_4$ ), mitochondrial potential ( $\Delta\Psi$ ), and mitochondrial swelling during the oxidation of glutamate and pyruvate were recorded in the presence of various concentrations of acylcarnitines. It was shown that all 4 acylcarnitines inhibited mitochondrial respiration activated by the ADP-hexokinase system ( $V_3$ ) and also induced mitochondrial swelling (in state 4). The magnitudes of the observed effects were inversely proportional to the carbon chain length of the acylcarnitines. In the case of HC, respiration inhibition and swelling were weak and were observed only at high concentrations of HC, exceeding 3 and 0.4 mM, respectively. Dissipation of  $\Delta\Psi$ , which characterizes the pore opening, was not observed during incubation of mitochondria with an excess of HC. The critical concentrations of PC, MC, and LC, at which a rapid fall of  $\Delta\Psi$  occurred, were 100, 110, and 500  $\mu\text{M}$ , respectively. PC, MC, and LC at concentrations of the order of 10, 25, and 200  $\mu\text{M}$ , respectively, induced significant swelling of mitochondria (>40%). Cyclosporin A and EGTA raised threshold concentrations of LCAC required for pore opening but were ineffective at higher concentrations of PC and MC. Thus, among the derivatives of saturated fatty acids with a carbon chain length from 6 to 16, PC and MC are the most toxic agents causing the induction of mPTP.

**Keywords:** acylcarnitines, mitochondrial permeability transition pore