

СОДЕРЖАНИЕ

Том 37, номер 3, 2020

ОБЗОРЫ

- Модификация гипоксических состояний при фотодинамической терапии
А. Б. Ганеев, Т. Г. Щербатюк 163
- Участие Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов
в синаптической пластичности
Л. П. Долгачева, С. Т. Тулеуханов, В. П. Зинченко 175
-
- ***
- Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек в цельной крови
под действием липопротеинов низкой плотности, модифицированных
в условиях, моделирующих галогенирующий и карбонильный стресс
*Л. Ю. Басырева, Е. В. Михальчик, А. К. Тихазе,
С. А. Гусев, В. З. Ланкин, О. М. Панасенко* 188
- Антиоксидантное действие природных полифенолов на митохондрии
печени крыс с токсическим гепатитом
*Д. И. Дергачева, О. И. Кляйн, А. А. Мариничев, Н. Н. Гесслер,
В. В. Теплова, Е. П. Исакова, Ю. И. Дерябина* 197
- NPY-рецепторы участвуют в изменении электрической активности рабочих
кардиомиоцитов правого предсердия и желудочка новорожденных крысят
*Н. Г. Исаков, А. А. Зверев, Т. А. Аникина,
Е. Н. Зверева, А. В. Крылова, Т. Л. Зефирова* 208
- Особенности состава нейтральных липидов эмбрионных
и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb.
*Н. В. Семёнова, В. Н. Шмаков, М. Э. Пак, И. Н. Третьякова,
Ю. М. Константинов, Л. В. Дударева* 215
- Влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата “Бункер”
на функционирование митохондрий озимой пшеницы
*Т. П. Побежимова, А. В. Корсукова, О. А. Боровик, Н. С. Забанова,
Н. В. Дорофеев, О. И. Грабельных, В. К. Войников* 224
- Морфометрический анализ внутренней ультраструктуры митохондрий
мышечной ткани волосатика *Gordionus alpestris* (Nematomorpha)
*Ч. М. Эльдаров, В. Б. Вайс, И. М. Вангели,
О. А. Аверина, Б. Д. Ефейкин, Л. Е. Бакеева* 235
-
-

Contents

Vol. 37, No. 3, 2020

REVIEWS

- Modification of Hypoxic States at Photodynamic Therapy
A. B. Gapeyev, T. G. Shcherbatyuk 163
- Participation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors in Synaptic Plasticity
L. P. Dolgacheva, S. T. Tuleukhanov, V. P. Zinchenko 175
-

- Neutrophil Extracellular Trap Formation in Whole Blood Caused by Low Density Lipoproteins Modified under Conditions Mimicking Halogenative and Carbonyl Stress
L. Y. Basyreva, E. V. Mikhalkhik, A. K. Tikhaze, S. A. Gusev, V. Z. Lankin, O. M. Panasenko 188
- Antioxidant Effect of Natural Polyphenols on Rat Liver Mitochondria with Toxic Hepatitis
D. I. Dergacheva, O. I. Klein, A. A. Marinichev, N. N. Gessler, V. V. Teplova, E. P. Isakova, Yu. I. Deryabina 197
- NPY Receptors Participate in the Change of Electrical Activity of Working Cardiomyocytes of the Right Atrium and Ventricle of Newborn Rats
N. G. Iskakov, A. A. Zverev, T. A. Anikina, E. N. Zvereva, A. V. Krulova, T. L. Zefirov 208
- Particularities of Neutral Lipid Composition in Embryogenic and Non-Embryogenic Cell Lines of *Larix sibirica* Ledeb.
N. V. Semenova, V. N. Shmakov, M. E. Park, I. N. Tretyakova, Yu. M. Konstantinov, L. V. Dudareva 215
- The Influence of Tebuconazole and Tebuconazole-Based Disinfectant “Bunker” on the Functioning of Winter Wheat Mitochondria
T. P. Pobezhimova, A. V. Korsukova, O. A. Borovik, N. S. Zabanova, N. V. Dorofeev, O. I. Grabelnych, V. K. Voinikov 224
- Morphometric Analysis of the Internal Ultrastructure of Mitochondria of Muscle Tissue of the Hair *Gordionus alpestris* (Nematomorpha)
C. M. Eldarov, V. B. Vays, I. M. Vangeli, O. A. Averina, B. D. Efeykin, L. E. Bakeeva 235
-
-

УДК 616.152.21:615.831

МОДИФИКАЦИЯ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

© 2020 г. А. Б. Гапеев^{а, *}, Т. Г. Щербатюк^{б, с}

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
“Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

^бПриволжский исследовательский медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, 603950 Россия

^сПушкинский государственный естественно-научный институт,
Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2019 г.

После доработки 14.10.2019 г.

Принята к публикации 29.10.2019 г.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) рассматривается как многообещающий подход к лечению злокачественных новообразований, эффект которой достигается за счет генерации активных форм кислорода при облучении фотосенсибилизатора светом. Активные формы кислорода вызывают прямое уничтожение опухолевых клеток, повреждение сосудов и активируют противоопухолевый иммунитет. Гипоксия опухолевой ткани, значительно снижающая эффективность ФДТ, является серьезным препятствием этого метода. Кроме того, потребление кислорода при ФДТ может еще больше усугубить гипоксию опухоли, что приводит к нежелательным последствиям, таким как множественная лекарственная устойчивость, ангиогенез, инвазивность опухоли и метастазирование. Целью настоящего исследования является обзор современной литературы о достижениях по преодолению или использованию опухолевой гипоксии для повышения терапевтической эффективности ФДТ. Рассмотрены стратегии снижения опухолевой гипоксии путем изменения микроокружения опухоли для улучшения оксигенации, разработки средств доставки кислорода или генерации кислорода *in situ*, независимой от кислорода ФДТ и ингибирования белков, связанных с гипоксией. Обобщены существующие подходы к использованию гипоксии опухоли при высвобождении лекарственных средств и биоредуктивной терапии.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы, активные формы кислорода, канцерогенез, гипоксия, противоопухолевое действие

DOI: 10.31857/S023347552002005X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания занимают второе место среди причин смертности во многих странах мира [1]. Основными методами лечения злокачественных опухолей по-прежнему являются хирургическое вмешательство, радио- и химиотерапия. Эти традиционные методы лечения отличаются наличием значительных побочных эффектов, обладают тяжелой переносимостью и не гарантируют полного выздоровления. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых, более эффективных и безопасных методов лечения онкологических заболеваний, а также способов снижения побочных эффектов традиционных методов терапии. Поиск

эффективных и щадящих методов лечения онкологических заболеваний ведется по разным направлениям, одним из которых является фотодинамическая терапия (ФДТ) злокачественных новообразований (ЗНО) [2–4]. Фотодинамическая терапия отличается от традиционных методов лечения своей минимальной инвазивностью, удобством и гибкостью, эффективностью и хорошей переносимостью пациентами, что имеет важное клиническое значение [5, 6].

Анализ литературы показывает, что физические воздействия противоопухолевой направленности, будь то ФДТ [4], гипербарическая оксигенация [7], так же как и один из основных методов терапии ЗНО – радиотерапия [8], имеют общие механизмы действия, связанные с развитием сво-

боднорадикальных реакций [9]. В связи с тем, что злокачественные клетки вырабатывают механизмы защиты от любых противоопухолевых средств, используемых при химио- и радиотерапии, крайне актуальной становится задача повышения их эффективности.

Фотодинамическая терапия рака интенсивно применяется в последние 30–40 лет во всем мире. Однако поиск новых способов повышения ее противоопухолевого действия и снижения гентоксического эффекта на нормальные клетки организма остается актуальным [4, 10, 11]. Одним из направлений кислородно-перекисной концепции онкогенеза [12] является активация в опухолевых клетках свободнорадикальных процессов, которые за счет повышения концентрации активных форм кислорода (АФК) приводят, в конечном итоге, к деструкции опухоли. Присутствие кислорода значительно увеличивает повреждение опухоли, преодолевая ее резистентность. Известно, что важной особенностью ЗНО является изменение уровня свободнорадикальных реакций, которое проявляется в повышенной антиоксидантной активности опухолевой ткани, с одной стороны, и истощении антиоксидантной системы защиты организма-опухоленосителя, с другой [13]. В связи с этим предлагается разделить противоопухолевые мероприятия на две группы [12]. Воздействия первой группы направлены на снижение в организме уровня свободнорадикального окисления (СРО), а второй, напротив, связаны с еще большей интенсификацией СРО в опухолевых клетках.

Многие солидные опухоли подвергаются острой гипоксии из-за ряда аномальных физиологических изменений в микроокружении опухоли, включая неконтролируемую пролиферацию опухолевых клеток, бесконтрольный ангиогенез, приводящий к появлению сосудистых мальформаций (патологических связей между венами и артериями) [14], дисфункцию лимфатической системы [15, 16].

В результате гипоксии опухоли терапевтическая эффективность ФДТ значительно снижается, в связи с чем преодоление гипоксии путем оксигенации опухоли было широко признано и исследовано для усиления ФДТ [17]. Кроме того, потребление кислорода при ФДТ еще больше усугубляет гипоксию опухоли, что приводит к множеству нежелательных последствий, таких как резистентность к химиотерапии, радиостойчивость, усиление ангиогенеза, инвазивность опухоли и метастазирование [18–20].

Целью настоящего исследования является обзор современной литературы о достижениях по преодолению или использованию опухолевой ги-

поксии для повышения терапевтической эффективности ФДТ.

1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ФДТ

ФДТ основана на воздействии светом определенной длины волны на опухолевую ткань, которая благодаря эффекту усиленной проницаемости и удержания макромолекулярных препаратов [21] селективно накапливает на некоторое время фотосенсибилизаторы (ФС) [22, 23]. Квант света, взаимодействуя с ФС, вызывает фотохимические реакции с образованием синглетного кислорода и свободных радикалов [24]. Основным механизмом ФДТ является повреждение клеток АФК и другими радикалами [25].

В 1900 году наблюдения двух разных исследователей привели к открытию гибели клеток под действием активированных светом химических соединений. Немецкий студент О. Рааб, изучая влияние красителя акридина на парамеции, заметил, что токсичность акридина изменяется в зависимости от действия на него света [26]. В том же году французский невролог Ж. Прайм обнаружил, что перорально вводимый эозин, используемый для лечения пациентов с эпилепсией, вызывает дерматит при облучении кожи солнечным светом [27]. Дальнейшие исследования Г. фон Таппейнера привели к появлению нового термина “Фотодинамическое действие” [28]. Первые исследования на людях были выполнены Ф. Мейером-Бетцем в 1913 году с использованием гематопорфирина, при нанесении которого на кожу ощущалась боль и наблюдалась припухлость на освещенных участках кожи [29]. С использованием производного гематопорфирина позднее было обнаружено, что это соединение накапливалось в опухолях и обладало способностью флуоресцировать [30]. Десять лет спустя было показано, что производные гематопорфирина можно использовать для лечения ЗНО у мышей: наблюдалось торможение роста глиомы в течение нескольких недель после лечения гематопорфирином [31], обнаружено полное уничтожение опухоли молочной железы у мышей с использованием гематопорфирина в сочетании с красным светом [32]. Исследование с участием 25 пациентов со злокачественными опухолями показало полный ответ на ФДТ в 98 из 113 опухолей, частичный ответ в 13 и только две опухоли оказались резистентными к ФДТ [2]. В настоящее время ФДТ используется при лечении онкологических заболеваний кожи, пищевода, легких, желчных протоков, мочевого пузыря, поджелудочной железы, нервной системы, женских репродуктивных органов, предстательной железы, опухолей головы и шеи как са-

мостоятельный метод, так и в качестве элемента комбинированного лечения и при паллиативной помощи [4, 33–36].

2. ПРИНЦИПЫ И МЕХАНИЗМЫ ФДТ

Считается, что большинство ФС продуцируют синглетный кислород, вызывающий окислительное повреждение клеток. Реакция синглетного кислорода с мембранными липидами инициирует перекисное окисление липидов и может привести к разрушению клеточных мембран. Он может реагировать с аминокислотами, что изменяет функциональность жизненно важных белков. Синглетный кислород обладает высокой реакционной способностью, его время жизни составляет около 40 нс, а максимальный радиус действия – 20 нм [37, 38]. Этот радиус действия (меньший, чем диаметр большинства органелл) вместе с локализованной активацией ФС путем облучения только тканей-мишеней теоретически делает ФДТ достаточно специфичной и контролируемой [4].

Клеточный ответ на фотоповреждение сильно зависит от множества факторов, ключевым из которых является локализация ФС [39]. ФДТ вызывает апоптоз, некроз и аутофагию опухолевых клеток в зависимости от локализации и концентрации ФС. Эта способность активировать различные пути гибели клеток делает ФДТ эффективной в отношении устойчивых к апоптозу опухолевых клеток, являющихся основным препятствием для других методов лечения ЗНО [40].

Существует три основных механизма уничтожения опухоли при ФДТ: прямое действие АФК, сосудистые эффекты, иммунные реакции (рис. 1) [41, 42]. Эффект прямого действия АФК на паренхимальные и стромальные клетки опухоли потенциально может быть ослаблен, поскольку генерация АФК зависит от концентрации кислорода. Неравномерная васкуляризация опухолевой ткани приводит к плохой доставке как кислорода, так и ФС, что является препятствием для прямого разрушения опухоли АФК. Для увеличения эффективности используют ФДТ, направленную на разрушение сосудов, снабжающих опухоль питательными веществами и кислородом [43]. Окислительный стресс, индуцируемый ФДТ, усиливает экспрессию белков теплового шока, факторов транскрипции, связанных с воспалением, и высвобождение воспалительных цитокинов [44]. Развивается острая воспалительная реакция и активируется противоопухолевый иммунитет [45]. Все это способствует уничтожению опухоли, детоксикации и регенерации тканей.

К сожалению, существует целый ряд недостатков, которые сдерживают активное применение ФДТ в онкологии. С развитием новых технологий, в том числе с использованием наноматериалов, пытаются усовершенствовать ФС, в частности повысить генерацию синглетного кислорода [47], снизить кожную фототоксичность [47, 48], повысить селективность по отношению к опухолевым клеткам [49, 50], увеличить глубину терапевтического воздействия на ткань [48, 51, 52] и обеспечить целевую доставку ФС [53]. Наличие гипоксических областей в опухолях оказывается одним из основных препятствий при лечении солидных опухолей [54]. Поэтому оксигенация тканей сильно влияет на эффективность ФДТ [17]. Для идеальной ФДТ фотосенсибилизатор должен обладать низкой темновой токсичностью, его доставка должна быть простой, целевой и безболезненной, для активации ФС должно использоваться излучение в ближней инфракрасной области с интенсивностью, необходимой для достаточной генерации синглетного кислорода; высокая селективность опухолей и быстрое выведение ФС из организма должны минимизировать светочувствительность кожи. Дальнейшее развитие ФДТ зависит от разработок новых улучшенных ФС, источников света и режимов облучения, новых модификаций метода в комбинации с другими терапевтическими подходами [4], что повысит эффективность ФДТ в клинической онкологии.

3. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ ГИПОКСИИ ОПУХОЛЕЙ ПРИ ФДТ

Из-за ограниченной диффузии кислорода в глубокие слои опухолей, включая средние слои и ядро опухоли, давление кислорода в этих областях составляет менее 10 мм рт. ст., что рассматривается как гипоксия опухоли [55]. Хотя такое низкое давление кислорода является фатальным для большинства нормальных клеток, многие опухолевые клетки адаптированы к выживанию в условиях гипоксии [56]. Гипоксические области в солидных опухолях слабо поддаются воздействию ФДТ [54]. Одной из стратегий преодоления опухолевой гипоксии является улучшение оксигенации тканей перед ФДТ. Считается, что использование гипербарического кислорода повышает эффективность ФДТ [7]. Тем не менее, эффективность этой стратегии сильно зависит от используемого протокола и типа опухоли. Для преодоления вызванной ФДТ гипоксии используют более низкую интенсивность светового потока или фракционированное освещение при ФДТ, но такие подходы также не решают проблемы гипоксии [57]. Одним из интересных подхо-

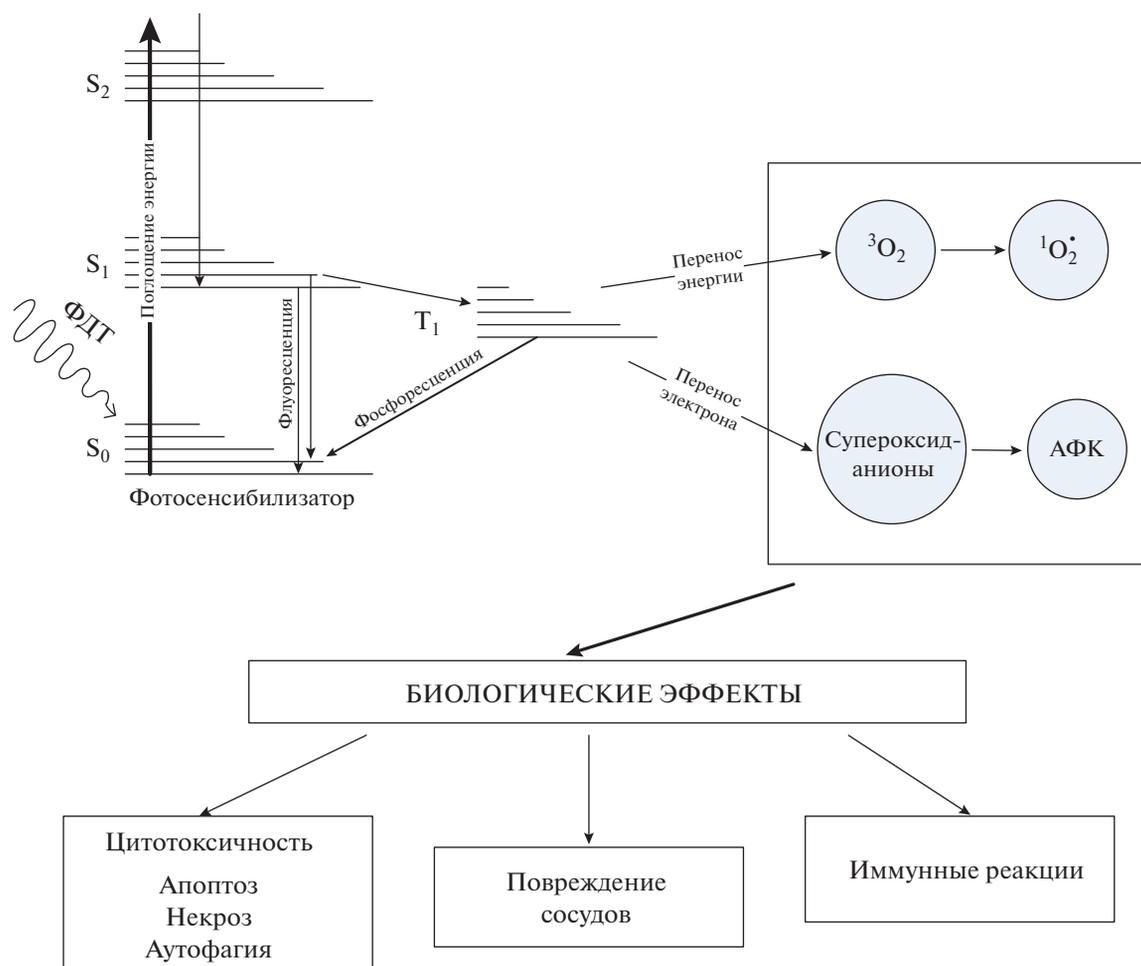


Рис. 1. Молекула фотосенсибилизатора в основном синглетном состоянии (S_0) возбуждается светом при ФДТ, при этом электрон переходит на орбиту с более высокой энергией (S_1). Молекула ФС может возвратиться из возбужденного в основное состояние с флуоресценцией или при внутреннем преобразовании энергии (порядка наносекунд) или за счет инверсии спина возбужденного электрона перейти в возбужденное триплетное состояние (T_1). Возбужденное триплетное состояние является относительно долгоживущим (порядка микросекунд). При ФДТ первого типа молекулы ФС в триплетном состоянии могут непосредственно взаимодействовать с молекулами биологического субстрата с образованием свободных радикалов – активных окислителей биологических структур. При ФДТ второго типа ФС в возбужденном триплетном состоянии может передавать энергию триплетному молекулярному кислороду (3O_2), что приводит к образованию биологически активного синглетного кислорода (1O_2), либо переносить электрон на супероксидные анионы, что приводит к образованию различных АФК, способных напрямую повреждать биологические макромолекулы. В результате возникают биологические эффекты ФДТ, в первую очередь включающие прямую цитотоксичность: апоптоз, некроз, аутофагия. Возможны не прямые эффекты – через повреждение сосудов (модифицировано по [42]).

дов для преодоления гипоксии является создание специализированных ФС, способных генерировать синглетный кислород в темновые периоды [46]. Доказано, что восстановление оксигенации опухолей с помощью наночастиц повышает терапевтический потенциал радио- и химиотерапии, а также ФДТ [58–60].

Области с низким содержанием кислорода уже присутствуют в опухоли до ФДТ или появляются из-за потребления кислорода при ФДТ или сосудистого коллапса [61]. Нерегулярная сосудистая

сеть опухоли уменьшает поступление кислорода в опухолевую ткань. Следовательно, нормализация сосудистой сети опухоли и предотвращение сосудистой обструкции являются многообещающими подходами для улучшения оксигенации опухолевых тканей. В последние десятилетия ряд исследований посвящен созданию благоприятных условий для лечения ЗНО путем изменения микроокружения опухоли, особенно путем ангиостатического лечения [62, 63]. Показано, что антиангиогенное лечение с использованием различных

ингибиторов, таких как ингибитор матричной металлопротеиназы приномастат, ингибитор циклооксигеназы-2, NS-398, ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), EMAP-II и IM862, заметно усиливали противоопухолевую эффективность ФДТ [64–66]. Эти ингибиторы способны регулировать, а не разрушать сосудистую сеть опухоли, что облегчает проникновение кислорода и лекарственных средств в солидную опухоль. Продемонстрировано, что ингибиторы тирозинкиназы, акситиниб или сорафениб, обеспечивают усиление противоопухолевого эффекта ФДТ за счет подавления экспрессии рецепторов 2-го типа к фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR-2) в сосудистой сети опухоли [67]. Установлена повышенная эффективность ФДТ благодаря введению гепарина – антикоагулянта, который используется в клинике для предотвращения внутрисосудистой коагуляции и тромбоза за счет усиления активности антитромбина III [68]. Однако усиление или восстановление кровотока под действием этих препаратов является кратковременным, что не обеспечивает необходимый приток кислорода и снижает терапевтический эффект ФДТ.

Разрабатывалась альтернативная стратегия перестройки микроокружения опухоли путем непосредственного разрушения внеклеточного матрикса гиалуронидазой, что приводило к усиленному эффекту “повышенной проницаемости и удержания” фотосенсибилизатора и насыщению опухоли кислородом [69]. Учитывая, что гиалуронан является ключевым компонентом внеклеточного матрикса, который служит гидратированным гелем для поддержки прогрессирования опухоли, вводили гиалуронидазу в солидную опухоль, чтобы разрушить гиалуронан до применения ФДТ. Разложение гиалуронана снижало давление внутритканевого кровотока и увеличивало плотность кровеносных сосудов опухоли, что заметно улучшало оксигенацию опухолевых тканей и способствовало терапевтическому эффекту ФДТ. Таким образом, изменение аномальных характеристик микроокружения опухоли может быть эффективным и надежным подходом для усиления противоопухолевого эффекта ФДТ.

Принимая во внимание способность эритроцитов транспортировать кислород в крови благодаря присутствию молекул гемоглобина, Liu et al. (2017) предложили гипотезу: “Эритроциты, используемые в качестве носителей для доставки ФС, могут транспортировать достаточное количество кислорода к опухолевым тканям, что будет способствовать преодолению существующей гипоксии в опухоли и пополнит содержание кислорода во время ФДТ” [70]. Основываясь на этой

гипотезе, исследователи разработали нанокапсулы ферритина, инкапсулирующие большое количество ФС ($ZnF_{16}Pc$), которые затем были конъюгированы с поверхностью эритроцитов [71]. В этой конструкции ФС постоянно находился в области с высоким содержанием кислорода, и, таким образом, скорость фотореакции, а также уровень образования синглетного кислорода были заметно выше, чем в простой смеси эритроцитов и ФС. ФДТ с участием эритроцитов продемонстрировала более высокий уровень подавления подкожно имплантированных опухолей U87MG. В целом, эритроциты, как эндогенный компонент с хорошей биосовместимостью в организме человека, обладают большими возможностями для оказания помощи при клиническом лечении ЗНО с помощью ФДТ. Молекулы гемоглобина сами по себе могут использоваться в качестве автономного переносчика кислорода для преодоления состояния гипоксии в опухолях. Синтезирован ФС второго поколения – конъюгированный с гемоглобином сополимер, который имеет мицеллярную форму для инкапсуляции фталоцианина цинка ($ZnPc$) [72]. Было показано, что получающиеся в результате наномицеллы генерируют больше АФК в клетках HeLa, чем мицеллы, нагруженные ФС без гемоглобина. При связывании ФС (индоцианиновый зеленый) и гемоглобина уровень производства АФК значительно возрастает по сравнению со свободным ФС [73].

Перфторуглероды, другой тип переносчиков кислорода, недавно были интегрированы с ФДТ для обеспечения непрерывной подачи кислорода. Перфторуглероды – это синтетические органические молекулы, состоящие из атомов углерода и фтора с формулой C_xF_y . Благодаря своей химической стабильности, низкому поверхностному натяжению и вязкости, а также уникальным липофобным и гидрофобным свойствам перфторуглероды широко используются в медицине в качестве контрастных веществ для процедур ультразвуковых исследований и магнитно-резонансной томографии, а также в качестве кровезаменителей [74]. Высокая электроотрицательность фтора обеспечивает перфторуглеродам большее по сравнению с эритроцитами средство к кислороду [75]. Важно, что перфторуглероды также обладают хорошей биосовместимостью, не вызывают побочных эффектов *in vivo* и могут эффективно выводиться с мочой или через кожные поры. Обогащенные кислородом капли перфторуглеродной эмульсии были использованы для усиления ФДТ [76]. Стоит отметить, что время жизни генерированных АФК в перфторуглеродной эмульсии при ФДТ *in vivo* было намного больше, чем в воде или в клеточной среде. Впоследствии была

синтезирована серия наномицелл с различным соотношением пентафторфенила к порфирину, и обнаружено, что производство синглетного кислорода увеличивается с ростом содержания пентафторфенила [77]. Предложен метод использования клинически адаптированного ультразвука в качестве вспомогательного инструмента для комбинированного применения ФДТ с перфторуглеродами [78]. При использовании ультразвука малой мощности в области опухоли высвобождение кислорода, растворенного в нанокляпях перфторуглеродной эмульсии, может быть значительно ускорено. Было продемонстрировано, что стратегия оксигенации, стимулируемая ультразвуком, может снизить локальную гипоксию опухоли и, таким образом, достигается значительное повышение эффективности ФДТ и радиотерапии.

Перекись водорода разлагается на воду и кислород под действием каталазы. Была предложена концепция совместной доставки каталазы и ФС для повышения эффективности ФДТ посредством производства кислорода *in situ* в опухолевых тканях [79–81]. Каталаза обладала сильной способностью разлагать перекись водорода в микроокружении опухоли и, таким образом, увеличивала оксигенацию опухоли, снижая опухолевую гипоксию.

В отличие от стандартной ФДТ, основанной на использовании кислорода для получения цитотоксичных АФК, ФДТ без кислорода могла бы дать большие преимущества для лечения опухолей в условиях гипоксии. Разработана разновидность пептидомиметиков, полученных из диарилэтена, которые могут генерировать АФК при освещении видимым светом без участия кислорода [82]. Пептидомиметик состоит из фотопереклячаемого диарилэтененового ядра и природного пептидного антибиотика грамицидина. Обнаружено, что генерируемый ультрафиолетом пептидомиметический изомер проявляет цитотоксическую активность при освещении видимым светом, что позволяет проводить лечение опухолей с помощью такой бескислородной ФДТ.

Гипоксия является одним из основных признаков опухолевой ткани [83]. Индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), состоящий из кислород-независимой субъединицы (HIF-1 β) и регулируемой кислородом субъединицы (HIF-1 α), тесно связан с гипоксией опухоли и служит большим препятствием для ФДТ [20]. Субъединица HIF-1 α деградирует в нормоксических клетках, но имеет тенденцию димеризоваться с помощью HIF-1 β с образованием HIF-1 и транслоцироваться в ядро в гипоксических клетках. После этого активный HIF-1 связывается с различными чувствительными к гипоксии генами, необходи-

мыми для ангиогенеза, гликолиза и выживания опухолевых клеток. Применение ФДТ еще более усугубляет гипоксию опухоли, что стимулирует экспрессию VEGF, сосудистый рост, и тем самым может приводить к пролиферации опухолевых клеток и метастазированию. Таким образом, возможен альтернативный подход, который не связан непосредственно с гипоксией, но снимает гипоксические осложнения путем снижения уровня HIF-1 [84]. Целенаправленное снижение HIF-1 α может быть перспективным методом для повышения эффективности ФДТ. Разработаны наночастицы для доставки малых интерферирующих РНК субъединицы HIF-1 α в сигма-рецептор, экспрессируемый клетками рака ротовой полости человека SAS и плоскоклеточной карциномы человека SCC4, при фотосан-опосредованной ФДТ [85]. Экспрессия HIF-1 α эффективно снижалась благодаря эффекту РНК-интерференции, что приводило к синергическому с ФДТ эффекту ингибирования роста опухолевых клеток. Показано, что низкомолекулярный ингибитор HIF-1 α акрифлавин, инкапсулированный с фталоцианином цинка в катионных липосомах, может эффективно связываться с HIF-1 α и блокировать димеризацию HIF-1 α и HIF-1 β , тем самым сенсibiliзуя гипоксические опухолевые клетки к ФДТ [86]. Комбинированное действие акрифлавина и ФДТ приводило к 3-кратному увеличению активности каспаз 3 и 7 в условиях гипоксии. Разработан фотосенсибилизатор BODIPY, конъюгированный с ацетазоламидом, ингибитором карбоангидразы IX, связанного с гипоксией фермента, который является маркером отдаленных метастазов и плохой выживаемости онкологических больных [87]. Ингибирование карбоангидразы IX может смягчить гипоксические эффекты, вызванные ФДТ, и повысить терапевтическую эффективность.

Гипоксические состояния могут быть в значительной степени преодолены путем применения озона [88], что было показано многолетними исследованиями, проведенными под эгидой Ассоциации российских озонотерапевтов. Доказано, что озон способен улучшить кровообращение и доставку кислорода в ишемизированные ткани [89, 90], устранить хронический окислительный стресс путем активизации антиоксидантной системы [91], вызывать активацию иммунной системы [92]. Принимая во внимание, что озонотерапия может уменьшить опухолевую гипоксию, привести к менее агрессивному поведению опухоли и служить действенным адъювантом во время ФДТ, проведены исследования по разработке способа повышения противоопухолевой эффективности ФДТ. Предварительно на штамме кар-

циномы почки крыс РА были исследованы генотоксические эффекты ФДТ для прогнозирования ответа опухоли на это воздействие [93]. Разработан способ, обеспечивающий повышение эффективности ФДТ за счет оптимизации выбора концентрации озона и режима введения озонированного физиологического раствора после сеансов ФДТ [94], и показано его слабое генотоксическое действие на ткани, не вовлеченные в опухолевый процесс [95].

Возможно, синергизм озонотерапии и ФДТ имеет большой потенциал и в клинических направлениях. Пока только в единичных исследованиях на практике сравнивается влияние озона и ФДТ [96]. Комбинированное действие озона и ФДТ на основе управления интенсивностью и направленностью окислительных процессов в организме-опухоленосителе может стать весьма перспективным при лечении ЗНО.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в преодолении гипоксии, в настоящее время ФДТ как отдельный противоопухолевый метод все еще не позволяет полностью элиминировать солидные опухоли. Более того, потребление большого количества кислорода и повторное применение ФДТ могут еще больше ухудшить микроокружение опухоли и привести к ряду неблагоприятных последствий, таким как устойчивость к терапии, инвазивность и метастазирование. Чтобы решить эту проблему, ФДТ нужно сочетать с другими подходами к лечению ЗНО, например, с химиотерапией.

4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФДТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ В КОМБИНАЦИИ С ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ К ГИПОКСИИ ПРЕПАРАТАМИ

ФДТ-индуцированная гипоксия может быть использована при совместном лечении с терапевтическими препаратами, которые активируются в условиях низкого содержания кислорода. Обострение гипоксического состояния при ФДТ может служить высокоспецифичным триггером, который обеспечивает избирательную доставку или активацию лекарственных средств непосредственно в опухоли, реализуя тем самым, противоопухолевый эффект с минимальной системной токсичностью. Имеются сведения о реагирующих на гипоксию химических компонентах, таких как нитрогруппы, хиноны, алифатические N-оксиды, ароматические N-оксиды и переходные металлы [97]. Разработаны активируемые гипоксией хитозановые наночастицы с нитроимидазольными группами для достижения селективного высвобождения лекарственного средства как при

внутренних (гипоксия), так и внешних (свет) триггерах [98]. В связи с наличием фрагментов, реагирующих на гипоксию, высвобождение ФС и противоопухолевых препаратов специфически происходило в гипоксических опухолевых клетках [99, 100].

Другим привлекательным методом использования гипоксии является совместная доставка ФС и биоредуктивных пролекарств, химически модифицированных форм лекарственных средств, которые в биологических средах в результате метаболических процессов превращаются в собственно лекарства. Они могут обладать селективной токсичностью для опухолевых клеток. Разработана наноструктура для совместной доставки ФС и тирапамина [101]. Тирапамин, типичное биоредуктивное пролекарство, может превращаться в цитотоксические радикалы с помощью различных внутриклеточных редуктазных ферментов. В нормоксических условиях эти радикалы легко окисляются до авирулентного исходного соединения, теряя цитотоксичность. В условиях гипоксии радикалы тирапамина вызывают сильное повреждение клеток. Основываясь на этом свойстве, гипоксия, индуцированная ФДТ в опухолях, использовалась для активации тирапамина, обеспечивая синергический эффект в уничтожении опухолевых клеток. Наночастицы мезопористого диоксида кремния с инкапсулированными ФС и тирапамином также продемонстрировали значимый противоопухолевый эффект при ФДТ [102]. Другие биоредуктивные пролекарства, например, TH-302, PR-104A и баноксантрон, хорошо изучены в клинических испытаниях и, как сообщается, демонстрируют сильную цитотоксичность, активируемую гипоксией [103–105]. Они редко используются совместно с ФДТ, однако их противоопухолевый потенциал в сочетании с ФДТ заслуживает особого внимания, поскольку ФДТ обладает способностью усиливать гипоксию опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотодинамическая терапия из-за ее минимальной инвазивности, относительной простоты процедур и высокой эффективности может стать многообещающей противоопухолевой технологией. Однако гипоксия опухолевой ткани, присутствующая солидным опухолям сама по себе и индуцируемая ФДТ, является критической проблемой ФДТ. Рассмотренные подходы преодоления гипоксии продемонстрировали возможности для улучшения оксигенации в опухолевых тканях. Следует отметить, что ФДТ кроме опухолевой гипоксии сталкивается с множеством других про-

блем, таких как ограниченная глубина проникновения света, нежелательная токсичность ФС для нормальных тканей при облучении светом, специфическая доставка ФС для глубоких опухолей и др. Разрабатываемые ФС должны соответствовать требованиям биосовместимости, биоразлагаемости, простоты и управляемости. Эти проблемы требуют разработки многофункциональных носителей, которые могут синергически преодолевать системные барьеры для обеспечения максимальной противоопухолевой эффективности. Побочным эффектом, вызываемым ФДТ, таким как инвазия опухоли и метастазирование, должно быть уделено отдельное особое внимание, поскольку им принадлежит известная роль в рецидивировании. Ожидается, что подходы к преодолению гипоксии и использованию гипоксии откроют новый путь для ФДТ, расширяя ее терапевтические возможности для клинического лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-02-00667.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдов М.И., Сельчук В.Ю., Никитаев В.Г., Нагорнов О.В., Проничев А.Н., Дмитриева В.В., Поляков Е.В., Расулов А.О., Кононец В.П., Мелихов С.А., Акимов И.С., Айдунбеков З.М., Кадашев В.И., Лаврова А.А., Голованова В.К., Пашнюк А.А. 2015. Физические методы исследований в экспертных системах диагностики онкологических заболеваний. *Краткие сообщения по физике Физического ин-та им. П.Н. Лебедева РАН*. **42** (8), 22–26.
2. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. **38**, 2628–2635.
3. Куценюк В.В., Гамалия Н.Ф. 2003. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей. *Онкология*. **5**, 69–72.
4. van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. 2017. Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers (Basel)*. **9** (2), pii E19.
5. Dąbrowski J.M., Arnaut L.G. 2015. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** (10), 1765–1780.
6. Mehraban N., Freeman H.S. 2015. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. *Materials (Basel)*. **8** (7), 4421–4456.
7. Moen I., Stuhr L.E. 2012. Hyperbaric oxygen therapy and cancer – A review. *Target Oncol.* **7**, 233–242.
8. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. 2004. *Радиобиология человека и животных. Учебное пособие*. М.: Высшая школа. 549 с.
9. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. 2006. *Физико-химические основы фотобиологических процессов*. М.: Дрофа. 285 с.
10. Барун В.В., Иванов А.П. 2012. Температурный режим биологической ткани при фотодинамической терапии. *Биофизика сложных систем*. **57** (1), 120–129.
11. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В., Смирнова З.С., Оборотова Н.А. 2014. Фотодинамическая терапия – способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей. *Рос. биотерапевт. журн.* **13**, 109–118.
12. Лю Б.И., Шайхутдинов Е.М. 1991. *Физико-химические и биокрибернетические аспекты онкогенеза*. Алма-Ата: Гылым. 270 с.
13. Козлов Ю.П. 1973. *Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах*. М.: Изд-во МГУ. 175 с.
14. Anand S., Majeti B.K., Acevedo L.M., Murphy E.A., Mukthavaram R., Schepcke L., Huang M., Shields D.J., Lindquist J.N., Lapinski P.E., King P.D., Weis S.M., Cheres D.A. 2010. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med*. **16** (8), 909–914.
15. Li S., Meng W., Guan Z., Guo Y., Han X. 2016. The hypoxia-related signaling pathways of vasculogenic mimicry in tumor treatment. *Biomed. Pharmacother.* **80**, 127–135.
16. Dang J., He H., Chen D., Yin L. 2017. Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). *Biomater. Sci.* **5** (8), 1500–1511.
17. Price M., Heilbrun L., Kessel D. 2013. Effects of the oxygenation level on formation of different reactive oxygen species during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **89**, 683–686.
18. Tsai Y.P., Wu K.J. 2012. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J. Biomed. Sci.* **19**, 102.
19. Liu Z.J., Semenza G.L., Zhang H.-F. 2015. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J. Zhejiang University Science B*. **16** (1), 32–43.
20. Zeng W., Liu P., Pan W., Singh S.R., Wei Y. 2015. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. *Cancer Lett.* **356** (2 Pt A), 263–267.
21. Maeda H., Tsukigawa K., Fang J. 2016. A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: Next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy – problems, solutions, and prospects. *Microcirculation*. **23** (3), 173–182.
22. Узденский А.Б. 2010. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии*. М.: Наука. 321 с.
23. Maeda H., Nakamura H., Fang J. 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 71–79.

24. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **3**, 380–387.
25. Bacellar I.O., Tsubone T.M., Pavani C., Baptista M.S. 2015. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 20523–20559.
26. Raab O. 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biol.* **39**, 524–526 (in German).
27. Prime J. 1900. *Des Accidents Toxiques Produits par l'Eosinate de Sodium*. 2nd ed. Jouve et Boyer: Paris, France.
28. Von Tappeiner H.A., Jodlbauer A. 1907. *Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen über die Photodynamische Erscheinung*. F.C.W. Vogel.: Leipzig, Germany (in German).
29. Meyer-Betz F. 1913. Untersuchungen über die biologische photodynamische Wirkung des Hematoporphyrins und anderer Derivate des Blut und Galenfarbstoffes. *Dtsch. Arch. Klin.* **112**, 476–503.
30. Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.M. 1961. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **26**, 1–11.
31. Diamond I., Granelli S.G., McDonagh A.F., Nielsen S., Wilson C.B., Jaenicke R. 1972. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*. **2**, 1175–1177.
32. Dougherty T.J., Grindey G.B., Fiel R., Weishaupt K.R., Boyle D.G. 1975. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115–121.
33. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clinicians*. **61**, 250–281.
34. He C., Liu D., Lin W. 2015. Self-assembled core-shell nanoparticles for combined chemotherapy and photodynamic therapy of resistant head and neck cancers. *ACS Nano*. **9** (1), 991–1003.
35. Шейко Е.А., Сустретов В.А., Шихлярова А.И. 2015. Фотодинамическая терапия в онкологии кожи (обзор литературы). *Межд. журн. прикладных и фундаментальных исследований*. **10**, 658–665.
36. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. 2016. Фотодинамическая терапия в клинической практике. *Biomed. Photonics*. **5** (2), 26–37.
37. Moan J., Berg K. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53**, 549–553.
38. Dysart J.S., Patterson M.S. 2005. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Phys. Med. Biol.* **50**, 2597–2616.
39. Henderson B.W., Dougherty T.J. 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**, 145–157.
40. Igney F.H., Krammer P.H. 2002. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 277–288.
41. Milla Sanabria L., Rodriguez M.E., Cogno I.S., Rumie Vittar N.B., Pansa M.F., Lamberti M.J., Rivalola V.A. 2013. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta*. 1835 (1), 36–45.
42. Brodin N.P., Guha C., Tome W.A. 2015. Photodynamic therapy and its role in combined modality anti-cancer treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **14** (4), 355–368.
43. Krzykawska-Serda M., Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Szczygiel M., Urbanska K., Stochel G., Elas M. 2014. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 239–251.
44. Reginato E., Wolf P., Hamblin M.R. 2014. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World J. Immunol.* **4**, 1–11.
45. Shams M., Owczarczak B., Manderscheid-Kern P., Bellnier D.A., Gollnick S.O. 2015. Development of photodynamic therapy regimens that control primary tumor growth and inhibit secondary disease. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 287–297.
46. Turan I.S., Yildiz D., Turksoy A., Gunaydin G., Akkaya E.U. 2016. A bifunctional photosensitizer for enhanced fractional photodynamic therapy: Singlet oxygen generation in the presence and absence of light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 2875–2878.
47. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. 2009. *Фотодинамическая терапия*. М.: Медицинское информационное агентство. 212 с.
48. O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. 2009. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **85**, 1053–1074.
49. Ormond A.B., Freeman H.S. 2013. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*. **6**, 817–840.
50. Rehman F.U., Zhao C., Jiang H., Wang X. 2016. Biomedical applications of nano-titania in theranostics and photodynamic therapy. *Biomater Sci.* **4** (1), 40–54.
51. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. 2006. Распределение света по глубине опухолевого очага и эффективность использования терапевтического излучения при фотодинамической терапии. *Рос. биотерапевт. журн.* **5** (3), 93–97.
52. Fan W., Huang P., Chen X. 2016. Overcoming the Achilles' heel of photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **45** (23), 6488–6519.
53. Yoon I., Li J.Z., Shim Y.K. 2013. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin. Endosc.* **46**, 7–23.

54. Casas A., Di Venosa G., Hasan T., Al B. 2011. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* **18**, 2486–2515.
55. Bennewith K.L., Dedhar S. 2011. Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. *BMC Cancer.* **11**, 504.
56. Seidi K., Jahanban-Esfahlan R., Zarghami N. 2017. Tumor rim cells: From resistance to vascular targeting agents to complete tumor ablation. *Tumour Biol.* **39** (3), 1010428317691001.
57. Middelburg T.A., de Bruijn H.S., van der Ploeg-van den Heuvel A., Neumann H.A., Robinson D.J. 2013. The effect of light fractionation with a 2-h dark interval on the efficacy of topical hexyl-aminolevulinic photodynamic therapy in normal mouse skin. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **10**, 703–709.
58. Ge J., Lan M., Zhou B., Liu W., Guo L., Wang H., Jia Q., Niu G., Huang X., Zhou H., Meng X., Wang P., Lee C.S., Zhang W., Han X. 2014. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nat. Commun.* **5**, 4596.
59. Gao S., Zhang L., Wang G., Yang K., Chen M., Tian R., Ma Q., Zhu L. 2016. Hybrid graphene/Au activatable theranostic agent for multimodalities imaging guided enhanced photothermal therapy. *Biomaterials.* **79**, 36–45.
60. Jahanban-Esfahlan R., de la Guardia M., Ahmadi D., Yousefi B. 2018. Modulating tumor hypoxia by nanomedicine for effective cancer therapy. *J. Cell. Physiol.* **233** (3), 2019–2031.
61. Hockel M., Vaupel P. 2001. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 266–276.
62. Jiang F., Zhang X., Kalkanis S.N., Zhang Z., Yang H., Katakowski M., Hong X., Zheng X., Zhu Z., Chopp M. 2008. Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma. *Photochem. Photobiol.* **84** (1), 128–137.
63. Ariffin A.B., Forde P.F., Jahangeer S., Soden D.M., Hinchion J. 2014. Releasing pressure in tumors: What do we know so far and where do we go from here? A review. *Cancer Res.* **74** (10), 2655–2662.
64. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N., Schwarz M.A., Gill P.S., Gomer C.J. 2000. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* **60** (15), 4066–4069.
65. Ferrario A., Von Tiehl K., Wong S., Luna M., Gomer C.J. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res.* **62** (14), 3956–3961.
66. Ferrario A., Chantrain C.F., von Tiehl K., Buckley S., Rucker N., Shalinsky D.R., Shimada H., DeClerck Y.A., Gomer C.J. 2004. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. *Cancer Res.* **64** (7), 2328–2332.
67. Weiss A., van Beijnum J.R., Bonvin D., Jichlinski P., Dyson P.J., Griffioen A.W., Nowak-Sliwinska P. 2014. Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: Lack of vascular normalization. *J. Cell. Mol. Med.* **18** (3), 480–491.
68. Yang L., Wei Y., Xing D., Chen Q. 2010. Increasing the efficiency of photodynamic therapy by improved light delivery and oxygen supply using an anticoagulant in a solid tumor model. *Lasers Surg. Med.* **42** (7), 671–679.
69. Gong H., Chao Y., Xiang J., Han X., Song G., Feng L., Liu J., Yang G., Chen Q., Liu Z. 2016. Hyaluronidase to enhance nanoparticle-based photodynamic tumor therapy. *Nano Lett.* **16** (4), 2512–2521.
70. Liu R., Spicer G., Chen S., Zhang H.F., Yi J., Backman V. 2017. Theoretical model for optical oximetry at the capillary level: Exploring hemoglobin oxygen saturation through backscattering of single red blood cells. *J. Biomed. Opt.* **22** (2), 25002.
71. Tang W., Zhen Z., Wang M., Wang H., Chuang Y.J., Zhang W., Wang G.D., Todd T., Cowger T., Chen H., Liu L., Li Z., Xie J. 2016. Red blood cell-facilitated photodynamic therapy for cancer treatment. *Adv. Funct. Mater.* **26**, 1757–1768.
72. Wang S., Yuan F., Chen K., Chen G., Tu K., Wang H., Wang L.Q. 2015. Synthesis of hemoglobin conjugated polymeric micelle: A ZnPc carrier with oxygen self-compensating ability for photodynamic therapy. *Bio-macromolecules.* **16** (9), 2693–2700.
73. Luo Z., Zheng M., Zhao P., Chen Z., Siu F., Gong P., Gao G., Sheng Z., Zheng C., Ma Y., Cai L. 2016. Self-monitoring artificial red cells with sufficient oxygen supply for enhanced photodynamic therapy. *Sci. Rep.* **6**, 23393.
74. Chen J., Pan H., Lanza G.M., Wickline S.A. 2013. Perfluorocarbon nanoparticles for physiological and molecular imaging and therapy. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **20** (6), 466–478.
75. Kaneda M.M., Caruthers S., Lanza G.M., Wickline S.A. 2009. Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. *Ann. Biomed. Eng.* **37** (10), 1922–1933.
76. Cheng Y., Cheng H., Jiang C., Qiu X., Wang K., Huan W., Yuan A., Wu J., Hu Y. 2015. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumor growth inhibition in photodynamic therapy. *Nat. Commun.* **6**, 8785.
77. Que Y., Liu Y., Tan W., Feng C., Shi P., Li Y., Huang X. 2016. Enhancing photodynamic therapy efficacy by using fluorinated nanoplateform. *ACS. Macro Lett.* **5**, 168–173.
78. Song X., Feng L., Liang C., Yang K., Liu Z. 2016. Ultrasound triggered tumor oxygenation with oxygen-shuttle nanoparticle to overcome hypoxia-associated resistance in cancer therapies. *Nano Lett.* **16** (10), 6145–6153.
79. Tang L., Yang X., Yin Q., Cai K., Wang H., Chaudhury I., Yao C., Zhou Q., Kwon M., Hartman J.A., Dobrucki I.T., Dobrucki L.W., Borst L.B., Lezmi S., Helferich W.G., Ferguson A.L., Fan T.M., Cheng J. 2014. Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (43), 15344–15349.

80. Chen H., Tian J., He W., Guo Z. 2015. H₂O₂-activatable and O₂-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137** (4), 153–1547.
81. Chen Q., Chen J., Liang C., Feng L., Dong Z., Song X., Song G., Liu Z. 2017. Drug-induced co-assembly of albumin/catalase as smart nano-theranostics for deep intra-tumoral penetration, hypoxia relieve, and synergistic combination therapy. *J. Control Release.* **263**, 79–89.
82. Babii O., Afonin S., Berditsch M., Reißer S., Mykhailiuk P.K., Kubyshkin V.S., Steinbrecher T., Ulrich A.S., Komarov I.V. 2014. Controlling biological activity with light: Diarylethene-containing cyclic peptidomimetics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3392–3395.
83. Parks S.K., Cormerais Y., Pouyssegur J. 2017. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. *J. Physiol.* **595** (8), 2439–2450.
84. Kopecka J., Porto S., Lusa S., Gazzano E., Salzano G., Giordano A., Desiderio V., Ghigo D., Caraglia M., De Rosa G., Riganti C. 2015. Self-assembling nanoparticles encapsulating zoledronic acid revert multidrug resistance in cancer cells. *Oncotarget.* **6** (31), 31461–31478.
85. Chen W.H., Lecaros R.L., Tseng Y.C., Huang L., Hsu Y.C. 2015. Nanoparticle delivery of HIF1 α siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. *Cancer Lett.* **359** (1), 65–74.
86. Broekgaarden M., Weijer R., Krekorian M., van den Ijssel B., Kos M., Alles L.K., van Wijk A.C., Bikadi Z., Hazai E., van Gulik T.M., Heger M. 2016. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 with acriflavine sensitizes hypoxic tumor cells to photodynamic therapy with zinc phthalocyanine-encapsulating cationic liposomes. *Nano Res.* **9**, 1639–1662.
87. Jung H.S., Han J., Shi H., Koo S., Singh H., Kim H.J., Sessler J.L., Lee J.Y., Kim J.H., Kim J.S. 2017. Overcoming the limits of hypoxia in photodynamic therapy: A carbonic anhydrase IX-targeted approach. *J. Am. Chem. Soc.* **139** (22), 7595–7602.
88. Luongo M., Brigida A.L., Mascolo L., Gaudino G. 2017. Possible therapeutic effects of ozone mixture on hypoxia in tumor development. *Anticancer Res.* **37** (2), 425–435.
89. Bocci V., Larini A., Micheli V. 2005. Restoration of normoxia by ozone therapy may control neoplastic growth: A review and a working hypothesis. *J. Altern. Complement. Med.* **11** (2), 257–265.
90. Bocci V. 2008. Does ozone really “cure” cancer? *Int. J. Cancer.* **123**, 1222.
91. Мартусевич А.А., Мартусевич А.К., Перетягин С.П. 2013. Особенности действия синглетного кислорода и озона на процессы липопероксидации и антиоксидантную систему крови и тканей крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **99** (9), 1057–1066.
92. Smith N.L., Wilson A.L., Gandhi J., Vatsia S., Khan S.A. 2017. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med. Gas. Res.* **7** (3), 212–219.
93. Чернигина И.А., Плеханова Е.С., Щербатюк Т.Г. 2017. Метод ДНК-комет в оценке уровня повреждения ДНК лейкоцитов крови после фотодинамической терапии. *Соврем. технологии в медицине.* **9**, 89–95.
94. Щербатюк Т.Г., Плеханова Е.С., Чернигина И.А., Терентюк Г.С., Бучарская А.Б. 2017. Новая экспериментальная схема лечения опухолей на основе фотодинамической терапии. *Рос. биотерапевт. журн.* **15**, 123.
95. Shcherbatyuk T.G., Chernigina I.A., Plekhanova E.S., Shakhov B.E. 2017. DNA damage after ozone-photodynamic therapy in cancer animals: Experimental research. *J. Pharmacy Pharmacol.* **5**, 497–505.
96. Camacho-Alonso F., Salmeron-Lozano P., Martinez-Beneyto Y. 2017. Effects of photodynamic therapy, 2% chlorhexidine, triantibiotic mixture, propolis and ozone on root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Odontology.* **105** (3), 338–346.
97. Wilson W.R., Hay M.P. 2011. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **11** (6), 393–410.
98. Lin Q., Bao C., Yang Y., Liang Q., Zhang D., Cheng S., Zhu L. 2013. Highly discriminating photorelease of anticancer drugs based on hypoxia activatable phototrigger conjugated chitosan nanoparticles. *Adv. Mater.* **25** (14), 1981–1986.
99. Kim K., Lee C.S., Na K. 2016. Light-controlled reactive oxygen species (ROS)-producible polymeric micelles with simultaneous drug-release triggering and endo/lysosomal escape. *Chem. Commun. (Camb.)* **52** (13), 2839–2842.
100. Park W., Bae B.C., Na K. 2016. A highly tumor-specific light-triggerable drug carrier responds to hypoxic tumor conditions for effective tumor treatment. *Bio-materials.* **77**, 227–234.
101. Liu Y., Liu Y., Bu W., Cheng C., Zuo C., Xiao Q., Sun Y., Ni D., Zhang C., Liu J., Shi J. 2015. Hypoxia induced by upconversion-based photodynamic therapy: Towards highly effective synergistic bioreductive therapy in tumors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54** (28), 8105–8109.
102. Chen W.H., Luo G.F., Qiu W.X., Lei Q., Liu L.H., Wang S.B., Zhang X.Z. 2017. Mesoporous silica-based versatile theranostic nanoplatform constructed by layer-by-layer assembly for excellent photodynamic/chemo therapy. *Biomaterials.* **117**, 54–65.
103. Hunter F.W., Wouters B.G., Wilson W.R. 2016. Hypoxia-activated prodrugs: Paths forward in the era of personalised medicine. *Br. J. Cancer.* **114** (10), 1071–1077.
104. O'Connor L.J., Cazares-Korner C., Saha J., Evans C.N., Stratford M.R., Hammond E.M., Conway S.J. 2016. Design, synthesis and evaluation of molecularly targeted hypoxia-activated prodrugs. *Nat. Protoc.* **11** (4), 781–794.
105. Phillips R.M. 2016. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77** (3), 441–457.

Modification of Hypoxic States at Photodynamic Therapy

A. B. Gapeyev^{1, *}, T. G. Shcherbatyuk^{2, 3}

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

²*Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

³*Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: a_b_g@mail.ru

Photodynamic therapy (PDT) is regarded as a promising approach to the treatment of malignant tumors, the effect of which is achieved due to generation of reactive oxygen species when the photosensitizer is irradiated with light. Reactive oxygen species cause direct destruction of tumor cells and vascular damage and activate anti-tumor immunity. Hypoxia of tumor tissue, significantly reducing the efficacy of PDT, creates a serious obstacle to this method. In addition, oxygen consumption in PDT may further aggravate tumor hypoxia, which leads to undesirable consequences, such as multidrug resistance, angiogenesis, tumor invasiveness, and metastasis. The purpose of this work is to review the current literature on the achievements in overcoming or using tumor hypoxia to increase the therapeutic efficacy of PDT. We consider strategies for overcoming of tumor hypoxia by modifying the tumor microenvironment to improve oxygenation, development of the means of oxygen delivery or oxygen generation in situ, oxygen-independent PDT, and inhibition of proteins associated with hypoxia. The existing approaches to usage of tumor hypoxia upon drug release and bioreductive therapy are summarized.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizers, reactive oxygen species, carcinogenesis, hypoxia, antitumor effect

УДК 577.352;576

УЧАСТИЕ Ca^{2+} -ПРОНИЦАЕМЫХ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

© 2020 г. Л. П. Долгачева^{а,*}, С. Т. Тулеуханов^б, В. П. Зинченко^{а,**}

^аФедеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

^бКазахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, 050040 Казахстан

*e-mail: dolgacheva@mail.ru

**e-mail: vpz@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2019 г.

После доработки 17.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

АМРА-рецепторы являются ключевыми молекулами синаптической передачи и участвуют в синаптической пластичности. При нарушении процессов, контролирующих сборку АМРА-рецепторов, миграцию и синапс-специфическую экспрессию, снижаются такие когнитивные функции головного мозга, как восприятие, обработка и анализ сигналов, запоминание, хранение и обмен информацией между нейронами. Содержание рецепторов в синапсе регулируется экзоцитозом, эндоцитозом и рециркуляцией. Несколько вспомогательных субъединиц и белков-партнеров участвуют в этих процессах и модулируют активность АМРА-рецепторов. Несмотря на то, что Ca^{2+} -проводящие АМРА-рецепторы (CP-AMPA), не содержащие субъединицу GluA2, экспрессированы далеко не во всех нейронах, они участвуют в синаптической пластичности, включая долговременное потенцирование и депрессию, и обеспечивают баланс возбуждения и торможения в мозге. Активация CP-AMPA в нейронах, вызывает быстрый постсинаптический вход Ca^{2+} , который индуцирует синаптическую пластичность через взаимодействие с другими Ca^{2+} -зависимыми сигнальными системами. Цель данного обзора состоит в том, чтобы обратить внимание исследователей на последние достижения в области участия CP-АМРА-рецепторов в синаптической пластичности.

Ключевые слова: Ca^{2+} -проницаемые АМРА-рецепторы, глутаматные рецепторы, интернейроны, синапс, синаптическая пластичность, долговременная потенциация, вспомогательные белки, нейродегенерация, полиамины, полиаминовый блок

DOI: 10.31857/S0233475520030044

ВВЕДЕНИЕ

Глутаматные АМРА-рецепторы классически рассматриваются как рецепторы-каналы, деполяризующие мембрану за счет проводимости по Na^+ , что обеспечивает прохождение возбуждающего сигнала через нейрональные синапсы, активацию потенциал-зависимых кальциевых

каналов и снятие магниевого блока с NMDA-рецепторов. Однако отдельные популяции АМРА-рецепторов, лишённые субъединицы GluA2, обладают кальциевой проводимостью, которая не зависит от мембранного потенциала [1], что дает возможность запускать процесс секреции нейротрансмиттеров без деполяризации и участия потенциал-зависимых кальциевых и NMDA-каналов. Ca^{2+} -проницаемость этих рецепторов имеет решающее значение при некоторых формах синаптической пластичности [1, 2] и клеточной гибели, происходящей при неврологических заболеваниях и расстройствах [3]. CP-АМРА-рецепторы вовлечены во множество нормально протекающих физиологических процессов, таких как процессы памяти и забывания [4]. Значительные изменения экспрессии GluA2-субъединицы происходят при различных патологических состояниях. Список нейродегенеративных заболеваний и нарушений развития мозга, в патогенезе

Сокращения: AMPARs – рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; TARP – трансмембранный AMPAR регулирующий белок (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins); CNH – корнишон гомолог (Cornichon homolog); GSG1L – трансмембранный вспомогательный белок (Germline-specific gene 1-like); SKAMP – цистеиновый узел содержащие АМРА-рецептор модулирующие белки (Cystine-knot AMPA receptor-modulating proteins); AKAP – А-киназу заякоривающий белок (A-kinase anchoring protein); PSD-95 – белок постсинаптического уплотнения (postsynaptic density); LTP – долговременная потенциация; LTD – долговременная депрессия; CaMKII – Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II).

которых СР-АМРА-рецепторы играют заметную роль, постоянно расширяется [3, 5, 6]. К ним относятся разные формы эпилепсии, болезни Альцгеймера и Паркинсона, шизофрения, амиотрофический боковой склероз, синдром аутизма, инсульт, глиобластома, наркомания и др. В настоящем обзоре представлены данные о роли СР-АМРА глутаматных рецепторов в синаптической функции и пластичности, гибели и выживании нейронов [5, 7].

1. ИОНОТРОПНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ГЛУТАМАТА

L-Глутамат является основным возбуждающим медиатором в синапсах центральной нервной системы позвоночных. Глутаматные ионотропные рецепторы подразделяются на три основных типа в соответствии с лигандом, селективно активирующим данный тип рецепторов: рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA-рецептор), α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (АМРА-рецептор) и каиноновой кислоты (КА-рецептор). NMDA-рецепторы являются лиганд- и потенциал-управляемыми каналами, и их активация зависит не только от связывания глутамата, но также от сопутствующей деполяризации постсинаптической мембраны, которая снимает блокирование этого канала ионами магния. АМРА-рецепторы являются только лиганд-управляемыми ионными каналами, участвующими в быстрой передаче возбуждения. Семейство КА глутаматных рецепторов отличается от других ионотропных глутаматных рецепторов разнообразием субъединиц, функций и локализацией, и поэтому представляет значительный интерес для модуляции синаптической передачи [8, 9]. КА-рецепторы могут быть тормозящими, поскольку часто локализованы в пресинаптической мембране ГАМК-ергических нейронов [10, 11].

2. АМРА-РЕЦЕПТОРЫ

АМРАs представляют собой тетрамерные ионные каналы, которые вместе с другими ионотропными глутаматными рецепторами (NMDA- и КА-рецепторами) опосредуют большую часть возбуждающей нейротрансмиссии в центральной нервной системе [12]. При связывании глутамата канал АМРА-рецептора открывается, что приводит к преимущественному входу натрия (или натрия и кальция), и вызывает деполяризацию постсинаптического нейрона [13, 14]. АМРА-зависимая быстрая деполяризация постсинаптической мембраны необходима для открытия Na^+ каналов, а также для снятия Mg^{2+} блока с NMDA-рецепторов [15]. АМРАs принимают участие в процессах долговременной потенциации (LTP) и

долговременной депрессии (LTD) [14]. Когнитивные функции головного мозга, такие, как восприятие, обработка и анализ сигналов, запоминание, хранение и обмен информацией, снижаются при нарушении процессов, контролируемых активностью АМРАs [16, 17]. Изменения активности АМРАs описаны при развитии многих заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, инсульт и эпилепсия.

Постсинаптические АМРАs конститутивно обновляются с большой скоростью [18]. Молекулярные и клеточные механизмы, контролирующие транспортировку АМРА-рецепторов в синапс, стабилизацию и время жизни в синапсе, являются предметом интенсивного и широкого исследования. АМРАs транспортируются в синапс путем латеральной диффузии в плазматической мембране или экзоцитозом [19]. Удаление АМРАs из плазмалеммы осуществляется в результате рецептор-зависимого эндоцитоза [20]. При этом небольшие окаймленные структуры сливаются между собой, образуя эндосомы. В ранних эндосомах рецепторы сортируются по различным путям транспортировки [21]: путь возвращения в плазмалемму, путь посттрансляционной модификации, и путь лизосомальной деградации (рис. 1).

АМРАs функционируют как тетрамеры, построенные из димерных комбинаций четырех основных субъединиц, GluA1–4 [22]. Тетрамеризация субъединиц происходит в результате взаимодействия между лиганд-связывающими, трансмембранными и N-концевыми сегментами [23, 24]. Функциональные свойства каналов АМРАs в значительной степени определяются составом субъединиц и регулируются редактированием посттранскрипционной РНК, посттрансляционной модификацией и вспомогательными белками. Процессы редактирования и посттрансляционной модификацией приводят к изменению числа рецепторов и появлению в синапсе рецепторов с другими свойствами.

При посттрансляционной модификации субъединицы рецепторных белков могут быть модифицированы путем ацетилирования, метилирования, фосфорилирования и др. Важную роль в моделировании функций глутаматных рецепторов играет фосфорилирование серина, треонина и тирозина С-концевого внутриклеточного домена субъединиц. Фосфорилирование/дефосфорилирование АМРА-рецептора может приводить к синаптической пластичности в норме и при патологии [25–28].

2.1. Редактирование субъединицы GluA2 на уровне мРНК

Субъединица GluA2, содержание которой определяет проводимость рецептора, проходит

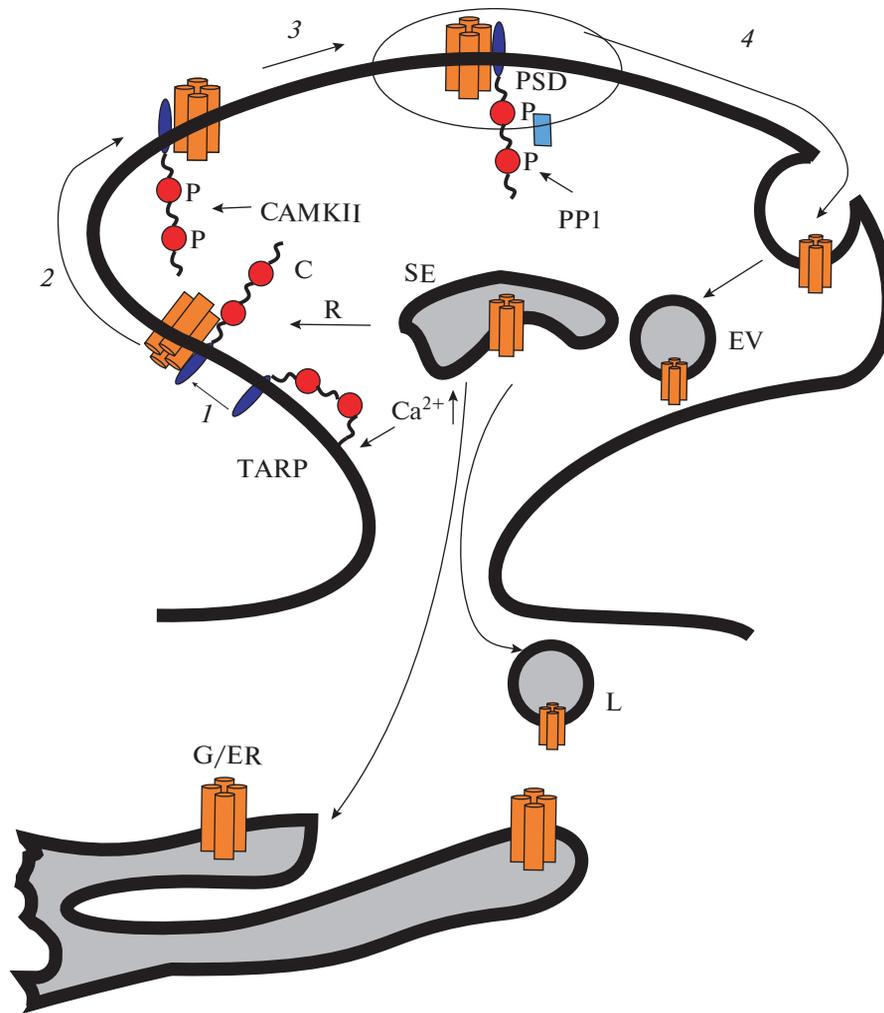


Рис. 1. Участие TARP в транспорте AMPARs. Увеличение концентрации Ca^{2+} в постсинапсе вызывает диссоциацию С-конца вспомогательного белка TARP (⚡) от цитоплазматической мембраны (1), инициирует взаимодействие TARP с AMPAR (⚡) и активирует протеинкиназу CAMKII. Фосфорилирование CAMKII киназой С-концевых участков белка TARP (старгазин) (2) ускоряет движение AMPAR к постсинаптическому уплотнению PSD, (3) вызывает связывание TARP со скаффолд-белком PSD-95 и способствует удерживанию AMPAR в PSD (3). Дефосфорилирование этих остатков фосфатазой (PP1) нарушает взаимодействие TARP-PSD-95 и освобождает AMPAR из постсинаптического уплотнения (4). Удаление AMPAR из плазмалеммы происходит в результате рецептор-зависимого эндоцитоза. Небольшие окаймленные структуры сливаются между собой и образуют ранние эндосомы (EV). В более зрелых, сортирующих эндосомах (SE), рецепторы распределяются по различным путям: путь возвращения в плазмалемму или рециклирование (R), путь посттрансляционной модификации через аппарат Гольджи (G/ER), путь лизосомальной (L) деградации.

редактирование на уровне мРНК. Группа Хайнемана была первой, кто показал, что отсутствие редактированной субъединицы GluA2 определяет Ca^{2+} -проводимость АМРА-рецепторов [29, 30]. Процесс редактирования мРНК гена данной субъединицы состоит в том, что перед началом трансляции мРНК взаимодействует с белком ADAR (аденозиндезаминаза РНК), который заменяет триплет CAG на CIG (аденозин заменяется на инозин). Соответствующие изменения происходят и в структуре белка — глутамин в 607-й позиции заменяется на аргинин. Также в 764 позиции аргинин заменяется на глицин [31]. Изменение заряда в поре канала приводит к потере кальциевой

проницаемости, сильно снижает проводимость одиночного канала рецептора и предотвращает блокирование канала внутриклеточными полиаминами [32]. Высокая проводимость для Ca^{2+} -рецепторов, не содержащих субъединицу GluA2, предполагает их значительную роль в индукции синаптической LTP, как в норме, так и при повреждении нейронов в патологических условиях.

2.2. Вспомогательные белки АМРА-рецепторов

Функции AMPARs в синапсе зависят не только от субъединичного состава (GluA1–4) [33], но также от взаимодействия рецептора с вспомога-

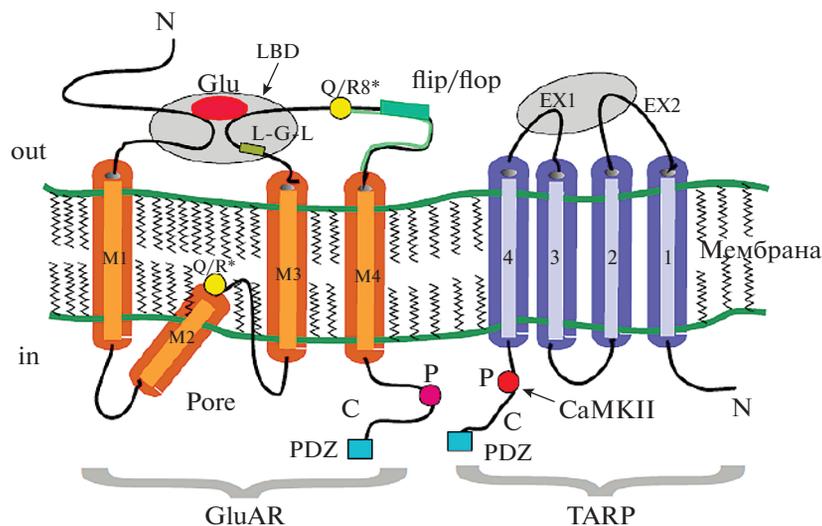


Рис. 2. Взаимодействие субъединицы AMPA-рецептора и белка TARP. Две экстраклеточные петли EX1 и EX2 белка TARP (серый овал) взаимодействуют с лиганд-связывающим доменом LBD – (серый овал) субъединицы AMPA-рецептора, управляя воротным механизмом канала. Проксимальная область С-концевого участка TARP взаимодействует с участком поры AMPA-рецептора (остаток Q/R, желтый круг), оказывая влияние на проводимость канала и полиаминовый блок. Красные круги – участки фосфорилирования. Синий квадрат – PDZ – связывающие домены GluAR и TARP, обеспечивающие взаимодействие с PSD-95. Glu – глутамат.

тельными белками [34, 35]. Участие различных вспомогательных белков в транспорте AMPA-рецепторов к синапсу интенсивно исследуется в последнее время [36]. Большинство субъединиц AMPAR находятся в комплексе с вспомогательными субъединицами, которые участвуют в экспрессии рецепторов, рециркуляции, пластичности, а также определяют их биофизические свойства [37]. В настоящее время известны такие вспомогательные белки AMPARs, как TARP, CNIN, GSG1L и SKAMP [38–40].

2.2.1. Вспомогательные трансмембранные регуляторные белки семейства TARP. Трансмембранные регуляторные белки (TARP) [41] направляют AMPARs в синапсы, участвуют в удержании/стабилизации AMPA-рецепторов в синапсе и модулируют активность рецептора, регулируя воротный механизм канала [42, 43]. На рис. 1, 2 показаны схемы взаимодействия субъединицы AMPA-рецептора и белка TARP при транспорте AMPA-рецепторов к синапсу.

Семейство TARP включает шесть изоформ, которые по-разному изменяют свойства AMPA-рецепторов. TARP $\gamma 2$, $\gamma 5$, и $\gamma 7$ участвуют в регуляции биофизических свойств Ca^{2+} -проводящих рецепторов (CP-AMPARs). TARP $\gamma 2$, $\gamma 5$ уменьшают чувствительность этих рецепторов к полиамину [44, 45], а TARP $\gamma 7$ избирательно усиливает синаптическую экспрессию CP-AMPAR и подавляет экспрессию кальций-непроницаемых AMPARs [46].

TARP $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ и $\gamma 8$ удерживают синаптические AMPARs посредством связывания со скаффолд-белком постсинаптического уплотнения PSD-95,

и эта стабилизация весьма важна для развития LTP [34]. Образованный комплекс TARP-PSD-95 уменьшает латеральную подвижность AMPARs в синапсе, а нарушение этого взаимодействия позволяет AMPARs в комплексе с TARP мигрировать из синапса [42]. Комплекс TARP-PSD-95 регулируется фосфорилированием ряда сериновых остатков во внутриклеточном С-концевом домене TARP. Фосфорилирование С-концевого домена TARP кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой CaMKII ингибирует его связывание с отрицательно заряженными фосфолипидами в липидном бислое и способствует связыванию с PSD-95 и удержанию рецептора в синапсе [47]. Дефосфорилирование этих же остатков фосфатазой PP1 [34], способствует ассоциации внутриклеточного домена TARP с фосфолипидами, нарушая взаимодействие TARP-PSD-95, и, следовательно, освобождает AMPARs из постсинаптического уплотнения [47]. Интернализация субъединиц GluA1 и GluA2 инициируется различными фосфатазами. Интернализация субъединицы GluA2 селективно блокируется ингибиторами PP2A (окадаевая кислота и фострицин), тогда как интернализация GluA1 предотвращается ингибиторами фосфатаз PP2A, PP1 и PP2B [48].

При высокочастотной стимуляции связывание глутамата с AMPARs уменьшает взаимодействие с TARP $\gamma 2$ [49], инициируя удаление рецепторов из синапсов [50, 51], чтобы позже, для развития LTP, пополнить синапс новыми или модифицированными рецепторами из внесинаптических компартментов. TARP $\gamma 2$ (старгазин)

функционирует как положительный аллостерический модулятор AMPARs: замедляет деактивацию рецептора, уменьшает десенситизацию, ускоряет восстановление после десенситизации, увеличивает сродство к агонистам, проницаемость для кальция и проводимость одиночного канала и уменьшает блокирование канала внутриклеточными полиаминами [41, 44, 52]. Продолжительность процесса удержания старгазинового AMPARs в синапсе увеличивается при длительном потенцировании за счет CaMKII -зависимого фосфорилирования остатков серина в С-концевом домене старгазина [35, 46]. Таким образом, взаимодействие между старгазином и PSD-95 регулирует обмен AMPARs между экстра-синаптическим и синаптическим компартментами.

2.2.2. Вспомогательные трансмембранные регуляторные белки семейства SKAMP. Белки, содержащие цистиновый узел и модулирующие AMPARs (Cystine-knot AMPA receptor-modulating proteins SKAMPs), представляют собой семейство, состоящее из четырех белков, которые влияют на транспорт, субклеточную локализацию и функцию AMPARs. Наиболее изученными членами SKAMP семейства являются белки SKAMP39, SKAMP44, SKAMP52 и SKAMP59. Все члены семейства SKAMP являются рецепторными трансмембранными белками типа I. Внеклеточные домены этих белков обогащены цистеином. Дисульфидные связи между цистеинами способствуют стабилизации глобулярной структуры, которая важна для взаимодействия с AMPARs и модуляции их активности. SKAMP44 и SKAMP52 были обнаружены в AMPA-рецепторных комплексах, которые также содержали TARP [54], что свидетельствовало о связывании SKAMP и TARP с различными областями субъединиц AMPARs. Показано, что белки TARP $\gamma 8$ и SKAMP44, которые высоко экспрессированы в гранулярных клетках зубчатой фасции гиппокампа, снижают скорость деактивации рецептора. Для эффективного транспорта AMPARs в определенную область на клеточной мембране необходима коэкспрессия обеих этих вспомогательных субъединиц [54]. Следует отметить, что все четыре члена семейства SKAMP различаются по профилю экспрессии и модулирующему влиянию на функцию AMPARs [55]. Последние исследования о роли семейства SKAMP белков приведены в обзоре [56].

2.2.3. Трансмембранный вспомогательный белок GSG1L. GSG1L (Germline-specific gene 1-like) был идентифицирован как вспомогательная субъединица AMPARs и имеет некоторое структурное сходство с TARPs [39]. Этот трансмембранный вспомогательный белок, в отличие от старгазина, снижает проводимость одиночного канала и кальциевую проницаемость рекомбинантных CP-AMPARs, тем самым расширяет функциональные свойства этих рецепторов [57].

2.2.4. Трансмембранный вспомогательный белок CNIH. Белки CNIH (Cornichon homolog protein) были идентифицированы протеомным анализом как белки, взаимодействующие с AMPARs [38]. Изменение уровня CNIH-2 в гиппокампе изменяло кинетику синаптических AMPARs, что указывало на регулируемую роль CNIH-2 в передаче, опосредованной AMPARs [58]. Совместная экспрессия рекомбинантных AMPARs с белками CNIH увеличивала экспрессию этих рецепторов и замедляла их деактивацию и десенситизацию [59, 60]. В нейронах гиппокампа и мозжечка CNIH-2 оказывал влияние на взаимодействие AMPARs и белков TARP ($\gamma 7$), регулируя количество TARPs в AMPA-рецепторном комплексе и изменяя параметры воротного механизма рецептора [61]. Нокаут CNIH-2/3 у мышей уменьшал количество AMPARs, содержащих субъединицу GluA1 в синапсе, что приводило к снижению, как AMPAR-опосредованной передачи, так и LTP [62].

Таким образом, взаимодействие AMPA-рецепторов с различными вспомогательными белками усиливает синаптическую экспрессию CP-AMPARs, рециркуляцию, пластичность, а также определяет биофизические свойства CP-AMPARs, уменьшает чувствительность этих рецепторов к полиаминам, меняет проводимость одиночного канала и кальциевую проницаемость рецептора. Необходимо заметить, что регуляция активности AMPARs вспомогательными белками усложняется тем, что влияние каждой из вспомогательных субъединиц зависит от состава субъединиц рецептора и модулируется другими вспомогательными субъединицами [54].

3. СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ

Синаптическая пластичность представляет собой способность синапсов менять силу передачи в зависимости от нейронной активности в ответ на внешние раздражители. Термин “синаптическая пластичность” для описания усиления синаптической передачи в 1948 году ввел Конорский [63]. Синаптическую пластичность также можно определить как структурную и функциональную адаптацию нейронных сетей к изменениям, связанным с обучением и памятью, влиянием окружающей среды и повреждением головного мозга [64].

Феномен увеличения силы синапса между двумя нейронами при передаче информации в головном мозге может сохраняться длительное время и известен как LTP. LTP является хорошо охарактеризованным видом синаптической пластичности, которая коррелирует с обучением и памятью [65]. Во многих работах показано, что LTP, вызываемая даже короткой высокочастотной стимуляцией, сохраняется в течение нескольких дней или даже недель *in vivo*. В зависимости от продолжительности эффекта синаптическая пластичность

разделена на несколько видов: (1) – кратковременная пластичность, когда изменения происходят в диапазоне от миллисекунд до минут и позволяют синапсам выполнять кратковременные вычислительные функции в нейронных цепях [66], (2) – долговременная пластичность, при которой изменения могут длиться от нескольких часов до дней, недель или даже месяцев [67, 68], (3) – гомеостатическая пластичность, которая может происходить как в синапсах, так и в нейронах, и позволяет стабилизировать уровни возбудимости и межнейронные связи, несмотря на изменения в окружающей среде, вызванные метаболизмом и пластичностью [69]. В LTP также можно выделить “раннюю фазу”, которая длится приблизительно 60 мин, требует активации NMDA-рецепторов, последующего входа Ca^{2+} и активации СаМКII [70, 71]. В это время также происходит транспорт новых AMPARs. И “позднюю” фазу LTP, которая продолжается дни и недели и требует экспрессии генов и синтеза белка [72, 73].

Длительная депрессия (LTD), это ослабление синаптической передачи в результате определенного режима высокочастотной активности синапсов. Известно, что эффект LTP или LTD зависит от того, какова частота стимуляции путей к пресинаптическому нейрону и каков уровень поляризации мембраны постсинаптического нейрона. Основным механизмом долговременной синаптической потенциации или депрессии обусловлен увеличением или уменьшением количества AMPA-рецепторов в синапсе [16, 74]. AMPA-рецепторы собираются в эндоплазматическом ретикулуме и затем транспортируются к плазматической мембране. Их содержание в синапсе находится в динамическом равновесии между увеличением посредством экзоцитоза и удалением посредством эндоцитоза [75].

4. УЧАСТИЕ CP-AMPARs В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧЕ И В ЕЕ ПЛАСТИЧНОСТИ

CP-AMPARs осуществляют альтернативный NMDA-рецептор-зависимому путь повышения Ca^{2+} в клетках и играют важную роль в синаптической передаче и в синаптической пластичности, вызывая LTP [2, 76–78]. CP-AMPARs имеют большую проводимость одиночного канала 7–8 pS, тогда как канал с GluA2 имеет проводимость около 300 fS [79]. Последние исследования дают убедительные доказательства участия CP-AMPARs в синаптической передаче и в ее пластичности [1, 3, 5, 80–82] как при нормальном функционировании мозга в процессах запоминания и обучения [2, 83], так и при патогенезе нервных заболеваний [84]. Также как NMDA-рецепторы, CP-AMPARs могут вызывать Ca^{2+} -зависимую эксайтотоксическую гибель клеток при различных патологиях [5, 7]. При ишемии происходит увеличение

CP-AMPARs в синапсе, что способствуют гибели нейронов [85]. А селективные блокаторы CP-AMPARs обладают нейропротекторным действием и препятствуют гибели нейронов при ишемии [86]. Повышенная экспрессия CP-AMPARs у мышей приводит к судорогам и преждевременной смерти в возрасте нескольких недель [87]. Кроме того, оказалось, что содержание CP-AMPARs увеличивается в вентральной области покрышки мозга мышей после однократной инъекции кокаина, что, как полагают, способствует пластичности, вызванной этим соединением [88].

При развитии LTP транспорт CP-AMPARs в синаптическую мембрану и удаление из нее усиливается. При этом CP-AMPARs транспортируются в синапсы гиппокампа из внесинаптических и/или внутриклеточных источников. Встраивание и удаление CP-AMPARs в синапс регулируется процессами фосфорилирования и дефосфорилирования С-концевого остатка S845 субъединицы GluA1 сAMP-зависимой протеинкиназой (PKA) и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинфосфатазой 2В (PP2В фосфатаза), соответственно. В синапсах области CA1 гиппокампа показано, что для индукции LTP необходима CP-AMPARs-зависимая активация PKA-зависимого синтеза белка [89]. Фосфорилирование приводит к накоплению GluA1 в постсинапсе, тогда как убиквитинирование субъединицы GluA1 E3-лигазой Nedd4-1 ведет к деградации AMPARs. Дефосфорилирование С-концевого домена GluA1 по серину 845 фосфатазой PP2В инициирует удаление CP-AMPARs из зоны постсинаптического уплотнения. Оптимизация этих процессов обеспечивается белком AKAP 150 (A-kinase anchoring protein), который заякоривает киназу и фосфатазу. Транспортировка самого белка AKAP150 активируется пальмитоилированием двух цистеиновых остатков.

В ряде работ показано, что после периода повышенной активности количество CP-AMPARs в синапсе возрастает [90, 91]. Последние исследования показали, что соотношение транспортируемых Ca^{2+} -проводящих и Ca^{2+} -непроводящих AMPA-рецепторов зависит от активности синапса. При слабой стимуляции в синапсе активируется транспорт CP-AMPARs, а при сильной стимуляции активируется транспорт AMPARs, содержащих GluA2 [92]. Показано, что для потенциации LTP при слабой стимуляции, которая направляет CP-AMPARs в синапсы, необходимо пальмитоилирование AKAP150, но при сильной стимуляции, которая рекрутирует AMPARs, содержащие GluA2, этого не происходит. Таким образом, пальмитоилирование AKAP150 регулирует субъединичный состав AMPARs в зависимости от степени активности синапса [92].

При развитии LTP CP-AMPARs включаются в состав синапса на определенное время (<25 мин),

а затем заменяются AMPARs, содержащими GluA2 [90, 93, 94]. Эксперименты с использованием филантотоксина-433, избирательно блокирующего CP-AMPA [95], показали, что его аппликация во время и сразу после индукции LTP предотвращает LTP, но после полного развития LTP филантотоксин был уже не эффективен [90, 93], что также говорит о быстром удалении CP-AMPA из синапса в этот период.

5. РОЛЬ ПОЛИАМИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ CP-AMPA В ПЛАСТИЧНОСТИ

В закрытом состоянии CP-AMPA блокируются потенциал-зависимо полиаминами [96, 97], такими как спермин и спермидин. Однако повторные активации постепенно приводят к снятию этого блока и усилению потока ионов через канал, что может быть причиной кратковременной пластичности синапсов, экспрессирующих CP-AMPA [97, 98]. Известно, что блокирование ионных каналов цитоплазматическими полиаминами в зависимости от потенциала является регуляторным механизмом для многих семейств катионных каналов [99]. Вспомогательный белок старгазин ослабляет полиаминовый блок и усиливает активность CP-AMPA, увеличивая проводимость одиночного канала и проницаемость для кальция. Принимая во внимание тот факт, что экспрессия CP-AMPA-рецепторов меняется при сетевой активности и увеличивается в мозге при развитии [100] и при различных заболеваниях [101, 102], полиамин-зависимая регуляция CP-AMPA является важным, постсинаптическим механизмом регуляции усиления синаптической передачи [98].

6. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ CP-AMPA ПРИ ПАТОЛОГИИ

Изменения экспрессии CP-AMPA или их активности наблюдаются при ряде серьезных неврологических заболеваниях, включая инсульт, эпилепсию, черепно-мозговые травмы и нейродегенеративные нарушения [101–104]. В работе [98] показано, что в нейронах гиппокампа области CA1 постишемическая пластичность AMPAR проявляется в увеличении содержания CP-AMPA и связана с возникающим при ишемии ацидозом. Нарушение транспорта CP-AMPA отмечено при болезни Альцгеймера. Амилоидные β -олигомеры индуцируют дефосфорилирование GluA1 по Ser-845 и подавляют механизм вовлечения и доставки CP-AMPA в синапсы на ранних стадиях заболевания [105, 106], что приводит к удалению AMPARs из плазматической мембраны, потере дендритных шипиков и синаптической депрессии [107].

7. УЧАСТИЕ CP-AMPA В ПЛАСТИЧНОСТИ ИНТЕРНЕЙРОНОВ

ГАМК-ергические тормозные интернейроны играют решающую роль в развитии и созревании нейронных сетей мозга, регуляции синаптической пластичности и в ритмогенезе [53, 108, 109]. Ослабление ГАМК-ергической передачи вызывает гипервозбуждение и гиперсинхронизацию нейронов в сети [110]. Нарушение работы тормозных нейронов приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как синдром Туретта, болезнь Паркинсона, шизофрения, эпилепсия и аутизм [111–114]. Тормозные нейроны не являются однородной популяцией и различаются по морфологическим, электрофизиологическим характеристикам и набору экспрессируемых белков [115]. Несколько подтипов ГАМК-ергических нейронов, содержат Ca^{2+} -связывающие белки в буферных концентрациях, что может ослаблять кратковременную пластичность и задерживать освобождение трансмиттера [116]. Последние исследования показали, что CP-AMPA коэкспрессированы с некоторыми Ca^{2+} -связывающими белками в нейронах определенного подтипа. Показано, что быстроразряжающиеся (fast spiking) интернейроны неокортекса [117, 118], гиппокампа [119, 120] и мозжечка [121], содержащие парвальбумин, также содержат CP-AMPA. При этом во время базальной синаптической активности CP-AMPA взаимодействуют с парвальбумином и Na^+/Ca^{2+} -обменником плазмалеммы [117, 121]. Таким образом, активация CP-AMPA в быстроразряжающихся интернейронах, содержащих парвальбумин, обеспечивает быстрый постсинаптический вход Ca^{2+} , который индуцирует процесс синаптической пластичности [120–124].

Учитывая тот факт, что в мозге взрослых особей CP-AMPA локализованы в основном в ГАМК-ергических нейронах, возбуждающее действие агонистов этих рецепторов и нейропротекторное действие антагонистов можно объяснить иннервацией этими нейронами других тормозных нейронов, контролируемых возбуждающими нейронами. Недавно было показано [125], что в гиппокампе крысы определенная субпопуляция ГАМК-ергических нейронов, содержащих CP-AMPA, может иннервировать ГАМК-ергические нейроны, содержащие кальций-проводящие каинатные рецепторы.

В заключение можно сказать, что CP-AMPA, наряду с NMDA-рецепторами, благодаря высокой кальциевой проводимости, являются активными участниками процессов синаптической пластичности в норме и в патологических условиях. Повышая базальный уровень Ca^{2+} в клетках по NMDA-рецептор-независимому пути, CP-AMPA играют важную роль в синаптической пластичности, вызывая LTP. Активация CP-AMPA, лока-

лизованных в ГАМК-ергических нейронах, может усиливать Ca^{2+} -зависимую секрецию ГАМК и, таким образом, участвовать в подавлении возбуждения иннервируемых нейронов [126, 127]. В отличие от NMDA-рецепторов, вклад которых в синаптические процессы изменяется в основном за счет кальций-зависимой десенситизации [128], активность CP-AMPA-рецепторов меняется за счет быстрого транспорта рецепторов в синапс после PKA-зависимого фосфорилирования и удаления из синапса после PP2B-зависимого дефосфорилирования. Также как NMDA-рецепторы, AMPARs могут вызывать Ca^{2+} -зависимую эксайтотоксическую гибель клеток при различных патологиях. Экспрессия CP-AMPA-рецепторов зависит от сетевой активности и увеличивается при ишемии, эпилепсии. При этом селективные ингибиторы CP-AMPA-рецепторов обладают нейропротекторным действием. Таким образом, изученные свойства, локализация и функции CP-AMPA-рецепторов позволяют рассматривать их в качестве потенциальной мишени селективного фармакологического воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки МОН Республики Казахстан (грант № AP05133528) и РФФИ (грант № 19-04-00138).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Isaac J.T., Ashby M.C., McBain C.J. 2007. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. **54**, 859–871.
2. Wiltgen B.J., Royle G.A., Gray E.E., Abdipranoto A., Thangthaeng N., Jacobs N., Saab F., Tonegawa S., Heinemann S.F., O'Dell T.J., Fanselow M.S., Vissel B. 2010. A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS ONE*. **5**, e12818.
3. Liu S.J., Zukin R.S. 2007. Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* **30**, 126–134.
4. Clem R.L., Huganir R.L. 2010. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*. **330** (6007), 1108–1112.
5. Pellegrini-Giampietro D.E., Gorter J.A., Bennet M.V., Zukin R.S. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* **20**, 464–470.
6. Bowie D. 2008. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **7**(2), 129–143.
7. Kwak S., Weiss J.H. 2006. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 281–287.
8. Contractor A., Swanson G.T., Sailer A., O'Gorman S., Heinemann S.F. 2000. Identification of the kainite receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *J. Neurosci.* **20** (22), 8269–8278.
9. Schmitz D., Frerking M., Nicoll R.A. 2000. Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*. **27** (2), 327–338.
10. Rodríguez-Moreno A., Lerma J. 1998. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabolic function. *Neuron*. **20** (6), 1211–1218.
11. Кононов А.В., Баль Н.В., Зинченко В.П. 2012. Регуляция спонтанных синхронных осцилляций Ca^{2+} в нейронах гиппокампа ГАМКергическими нейронами, содержащими кайнатные рецепторы без десенситизации. *Биол. мембраны*. **29** (1), 133–138.
12. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496.
13. Scannevin R.H., Huganir R.L. 2000. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **1** (2), 133–141.
14. Henley J.M., Wilkinson K.A. 2016. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 337–350.
15. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. 1984. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. **309**, 261–263.
16. Henley J.M., Wilkinson K.A. 2013. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15** (1), 11–27.
17. Cheng G.R., Li X.Y., Xiang Y.D., Liu D., McClintock S.M., Zeng Y. 2017. The implication of AMPA receptor in synaptic plasticity impairment and intellectual disability in fragile X syndrome. *Physiol. Res.* **66** (5), 715–727.
18. Lu W., Roche K.W. 2012. Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 470–479.
19. Wierenga C.J., Ibata K., Turrigiano G.G. 2005. Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J. Neurosci.* **25**, 2895–2905.
20. Choquet D., Triller A. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 251–265.
21. van der Sluijs P., Hoogenraad C.C. 2011. New insights in endosomal dynamics and AMPA receptor trafficking. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **22**, 499–505.
22. Huganir R.L., Nicoll R.A. 2013. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*. **80**, 704–717.
23. Mansour M., Nagarajan N., Nehring R.B., Clements J.D., Rosenmund C. 2001. Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron*. **32**, 841–853.
24. Kim K.S., Yan D., Tomita S. 2010. Assembly and stoichiometry of the AMPA receptor and transmembrane AMPA receptor regulatory protein complex. *J. Neurosci.* **30** (3), 1064–1072.

25. Soderling T.R., Derkach V.A. 2000. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* **23** (2), 75–80.
26. Barria A., Muller D., Derkach V., Griffith L.C., Soderling T.R. 1997. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science.* **276**, 2042–2045.
27. Benke T., Traynelis S.F. 2019. AMPA-type glutamate receptor conductance changes and plasticity: Still a lot of noise. *Neurochem. Res.* **44** (3), 539–548.
28. Rakhade, S.N., Zhou C., Aujla P.K., Fishman R., Sucher N.J., Jensen F.E. 2008. Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J. Neurosci.* **28** (32), 7979–7990.
29. Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA – gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* **252**, 851–853.
30. Hume R.I., Dingledine R., Heinemann S.F. 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science.* **253**, 1028–1031.
31. Sommer B., Kohler M., Sprengel R., Seeburg P.H. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell.* **67**, 11–19.
32. Verdoorn T.A., Burnashev N., Monyer H., Seeburg P.H., Sakmann B. 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science.* **252**, 1715–1718.
33. Hollmann M., Boulter J., Maron C., Heinemann S. 1994. Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren. Physiol. Biochem.* **17** (3–4), 182–183.
34. Schwenk J., Harmel N., Brechet A., Zolles G., Berkefeld H., Müller C.S., Bildl W., Baehrens D., Hüber B., Kulik A., Klöcker N., Schulte U., Fakler B. 2012. High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes. *Neuron.* **74** (4), 621–633.
35. Joshi P., Moradipour M., Nerkar A., Sawant S.D. 2012. AMPA receptor: A review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 39–44.
36. Bissen D., Foss F., Acker-Palmer A. 2019. AMPA receptors and their minions: Auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **76** (11), 2133–2169.
37. Blair L.J., Criado-Marrero M., Zheng D., Wang X., Kamath S., Nordhues B.A., Weeber E.J., Dickey C.A. 2019. The disease-associated chaperone FKBP51 impairs cognitive function by accelerating AMPA receptor recycling. *eNeuro.* **6** (1), ENEURO.0242–18.2019.
38. Schwenk J., Harmel N., Zolles G., Bildl W., Kulik A., Heimrich B., Chisaka O., Jonas P., Schulte U., Fakler B., Klöcker N. 2009. Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science.* **323**, 1313–1319.
39. Shanks N.F., Savas J.N., Maruo T., Cais O., Hirao A., Oe S., Ghosh A., Noda Y., Greger I.H., Yates J.R. 3rd., Nakagawa T. 2012. Differences in AMPA and kainate receptor interactomes facilitate identification of AMPA receptor auxiliary subunit GSG1L. *Cell Rep.* **1**, 590–598.
40. Farrow P., Khodosevich K., Sapir Y., Schulmann A., Aslam M., Stern-Bach Y., Monyer H., von Engelhardt J. 2015. Auxiliary subunits of the CKAMP family differentially modulate AMPA receptor properties. *Elife.* **4**, e09693.
41. Tomita S., Stein V., Stocker T.J., Nicoll R.A., Brecht D.S. 2005. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron.* **45**, 269–277.
42. Bats C., Groc L., Choquet D. 2007. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron.* **53**, 719–734.
43. Coombs I.D., Cull-Candy S.G. 2009. Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum. *Neuroscience.* **162**, 656–665.
44. Soto D., Coombs I.D., Kelly L., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2007. Stargazin attenuates intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **10**, 1260–1267.
45. Soto D., Coombs I.D., Renzi M., Zonouzi M., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2009. Selective regulation of long-form calcium-permeable AMPA receptors by an atypical TARP, γ -5. *Nat. Neurosci.* **12**, 277–285.
46. Studniarczyk D., Coombs I., Cull-Candy S.G., Farrant M. 2013. TARP γ -7 selectively enhances synaptic expression of calcium-permeable AMPARs. *Nat. Neurosci.* **16** (9), 1266–1274.
47. Sumioka A., Yan D., Tomita S. 2010. TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. *Neuron.* **66**, 755–767.
48. Benke T., Traynelis S.F. 2019. AMPA-type glutamate receptor conductance changes and plasticity: Still a lot of noise. *Neurochem. Res.* **44** (3), 539–548.
49. Chen L., Chetkovich D.M., Petralia R.S., Sweeney N.T., Kawasaki Y., Wenthold R.J., Brecht D.S., Nicoll R.A. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature.* **408**, 936–943.
50. Morimoto-Tomita M., Zhang W., Straub C., Cho C.H., Kim K.S., Howe J.R., Tomita S. 2009. Autoinactivation of neuronal AMPA receptors via glutamate-regulated TARP interaction. *Neuron.* **61**, 101–112.
51. Constals A., Penn A.C., Compans B., Toulmé E., Phillipat A., Marais S., Retailleau N., Hafner A.S., Coussen F., Hossy E., Choquet D. 2015. Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron.* **85**, 787–803.
52. Priel A., Kollerker A., Ayalon G., Gillor M., Osten P., Stern-Bach Y. 2005. Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J. Neurosci.* **25**, 2682–2686.
53. Opazo P., Labrecque S., Tigaret C.M., Frouin A., Wiseman P.W., De Koninck P., Choquet D. 2010.

- CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*. **67** (2), 239–252.
54. Khodosevich K., Jacobi E., Farrow P., Schulmann A., Rusu A., Zhang L., Sprengel R., Monyer H., von Engelhardt J. 2014. Coexpressed auxiliary subunits exhibit distinct modulatory profiles on AMPA receptor function. *Neuron*. **83**, 601–615.
 55. von Engelhardt J., Mack V., Sprengel R., Kavenstock N., Li K.W., Stern-Bach Y., Smit A.B., Seeburg P.H., Monyer H. 2010. CKAMP44: A brain-specific protein attenuating short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Science*. **327**, 1518–1522.
 56. von Engelhardt J. 2019. AMPA Receptor Auxiliary Proteins of the CKAMP Family. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (6), E1460.
 57. McGee T.P., Bats C., Farrant M., Cull-Candy S.G. 2015. Auxiliary subunit GSG1L acts to suppress calcium-permeable AMPA receptor function. *J. Neurosci.* **35** (49), 16171–16179.
 58. Boudkazi S., Brechet A., Schwenk J., Fakler B. 2014. Cornichon2 dictates the time course of excitatory transmission at individual hippocampal synapses. *Neuron*. **82**, 848–858.
 59. Kato A.S., Gill M.B., Ho M.T., Yu H., Tu Y., Siuda E.R., Wang H., Qian Y.W., Nisenbaum E.S., Tomita S., Brecht D.S. 2010. Hippocampal AMPA receptor gating controlled by both TARP and cornichon proteins. *Neuron*. **68**, 1082–1096.
 60. Shi Y., Suh Y.H., Milstein A.D., Isozaki K., Schmid S.M., Roche K.W., Nicoll R.A. 2010. Functional comparison of the effects of TARPs and cornichons on AMPA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 16315–16319.
 61. Gill M.B., Kato A.S., Roberts M.F., Yu H., Wang H., Tomita S., Brecht D.S. 2011. Cornichon-2 modulates AMPA receptor-transmembrane AMPA receptor regulatory protein assembly to dictate gating and pharmacology. *J. Neurosci.* **31**, 6928–6938.
 62. Herring B.E., Shi Y., Suh Y.H., Zheng C.Y., Blankenship S.M., Roche K.W., Nicoll R.A. 2013. Cornichon proteins determine the subunit composition of synaptic AMPA receptors. *Neuron*. **77**, 1083–1096.
 63. Konorski J. 1948. *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge, UK: Hefner Press. 267 p.
 64. Malenka R.C., Nicoll R.A. 1999. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science*. **285**, 1870–1874.
 65. Bliss T.V., Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356.
 66. Abbott L.F., Regehr W.G. 2004. Synaptic computation. *Nature*. **431**, 796–803.
 67. Abraham W.C. 2003. How long will long-term potentiation last? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **358**, 735–744.
 68. Martin S.J., Grimwood P.D., Morris R.G.M. 2000. Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 649–711.
 69. Turrigiano G. 2011. Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 89–103.
 70. Malinow R., Schulman H., Tsien R.W. 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*. **245**, 862–866.
 71. Silva A.J., Stevens C.F., Tonegawa S., Wang Y. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. **257**, 201–206.
 72. Reymann K.G., Frey J.U. 2007. The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, “synaptic tagging”, “late-associativity” and implications. *Neuropharmacology*. **52**, 24–40.
 73. Johnstone V.P., Raymond C.R. 2011. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. *Learn. Mem.* **18**, 625–633.
 74. Malenka R.C., Bear M.F. 2004. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*. **44** (1), 5–21.
 75. Malinow R., Malenka R.C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 103–126.
 76. Jia Z., Agopyan N., Miu P., Xiong Z., Henderson J., Gerlai R., Taverna F.A., Velumian A., Macdonald J., Carlen P., Abramow-Newerly W., Roder J. 1996. Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron*. **17**, 945–956.
 77. Harvery S.C., Koster A., Yu H., Skolnick P., Baum-barger P., Nisenbaum E.S. 2001. AMPA receptor function is altered in GluR2-deficient Mice. *J. Mol. Neurosci.* **17**, 35–43.
 78. Meng Y., Zhang Y., Jia Z. 2003. Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. *Neuron*. **39**, 163–176.
 79. Swanson G.T., Kamboj S.K., Cull-Candy S.G. 1997. Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J. Neurosci.* **17**, 58–69.
 80. Geiger J.R., Melcher T., Koh D.S., Sakmann B., Seeburg P.H., Jonas P., Monyer H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺-permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. **15**, 193–204.
 81. Зайцев А.В., Ким К.Х., Магазаник Л.Г. 2012. Роль кальций-проницаемых AMPA рецепторов в механизме дисинаптического торможения в префронтальной коре крысы. *Биол. мембраны*. **29** (1–2), 114–122.
 82. Cull-Candy S., Kelly L., Farrant M. 2006. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: Synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 288–297.
 83. Riedel G., Micheau J., Lam A.G., Roloff E.L., Martin S.J., Bridge H., De Hoz L., Poeschel B.,

- Mcculloch J., Morris R.G. 1999. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature*. **2**, 898–905.
84. Wright A., Vissel B. 2012. The essential role of AMPA receptor GluA2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 34.
85. Liu B., Liao M., Mielke J.G., Ning K., Chen Y., Li L., El-Hayek Y.H., Gomez E., Zukin R.S., Fehlings M.G., Wan Q. 2006. Ischemic insults directs glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J. Neurosci.* **26**, 5309–5319.
86. Noh K.M., Yokota H., Mashiko T., Castillo P.E., Zukin R.S., Bennet M.V. 2005. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 12230–12235.
87. Brusa R., Zimmermann F., Koh, D.S., Feldmeyer D., Gass P., Seeburg P.H., Sprengel R. 1995. Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science*. **270**, 1677–1680.
88. Bellone C., Luscher C. 2006. Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed *in vivo* by mGluR-dependent long-term depression. *Nat. Neurosci.* **9**, 636–641.
89. Park P., Kang H., Sanderson T.M., Bortolotto Z.A., Georgiou J., Zhuo M., Kaang B.K., Collingridge G.L. 2018. The role of calcium-permeable AMPARs in long-term potentiation at principal neurons in the rodent hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* **10**, 42.
90. Plant K., Pelkey K.A., Bortolotto Z.A., Morita D., Terashima A., McBain C.J., Collingridge G.L., Isaac J.T.R. 2006. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **9**, 602–604.
91. Yang Y., Wang X.-B., Frerking M., Zhou Q. 2008. Delivery of AMPA receptors to perisynaptic sites precedes the full expression of long term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 11388–11393.
92. Purkey A.M., Woolfrey K.M., Crosby K.C., Stich D.G., Chick W.S., Aoto J., Dell'Acqua M.L. 2018. AKAP150 Palmitoylation regulates synaptic incorporation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to control LTP. *Cell Rep.* **25**, 974–987.
93. Jaafari N., Henley J.M., Hanley J.G. 2012. PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci.* **32** (34), 11618–11630.
94. Park P., Sanderson T.M., Amici M., Choi S.L., Bortolotto Z.A., Zhuo M., Kaang B.K., Collingridge G.L. 2016. Calcium-permeable AMPA receptors mediate the induction of the protein kinase A-dependent component of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Neurosci.* **36** (2), 622–631.
95. Washburn M.S., Dingledine R. 1996. Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 669–678.
96. Bowie D., Mayer M.L. 1995. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*. **15**, 453–462.
97. Koh D.S., Burnashev N., Jonas P. 1995. Block of native Ca²⁺-permeable AMPA receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *J. Physiol.* **486**, 305–312.
98. Rozov A., Zakharova Y., Vazetdinova A., Valiullina-Rakhmatullina F. 2018. The role of polyamine-dependent facilitation of calcium permeable AMPARs in short-term synaptic enhancement. *Front. Cell Neurosci.* **12**, 345.
99. Baronas V.A., Kurata H.T. 2014. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front. Physiol.* **5**, 325.
100. Lujan B., Dagostin A., von Gersdorff H. 2019. Presynaptic diversity revealed by Ca²⁺-permeable AMPA receptors at the calyx of held synapse. *J. Neurosci.* **39** (16), 2981–2994.
101. Spaethling J.M., Klein D.M., Singh P., Meaney D.F. 2008. Calcium-permeable AMPA receptors appear in cortical neurons after traumatic mechanical injury and contribute to neuronal fate. *J. Neurotrauma*. **25**, 1207–1216.
102. Szczurowska E., Ergang P., Kubova H., Druga R., Salaj M., Mares P. 2016. Influence of early life status epilepticus on the developmental expression profile of the GluA2 subunit of AMPA receptors. *Exp. Neurol.* **283**, 97–109.
103. Pellegrini-Giampietro D.E., Zukin R.S., Bennett M.V., Cho S., Pulsinelli W.A. 1992. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 10499–10503.
104. Whitehead G., Regan P., Whitcomb D.J., Cho K. 2017. Ca²⁺-permeable AMPA receptor: A new perspective on amyloid- β mediated pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. **112**, 221–227.
105. Li S., Hong S., Shepardson N.E., Walsh D.M., Shankar G.M., Selkoe D. 2009. Soluble oligomers of amyloid β protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. **62**, 788–801.
106. Miñano-Molina A.J., España J., Martín E., Bareda-Zahonero B., Fadó R., Solé M., Trullás R., Saura C.A., Rodríguez-Alvarez J. 2011. Soluble oligomers of amyloid- β peptide disrupt membrane trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor contributing to early synapse dysfunction. *J. Biol. Chem.* **286**, 27311–27321.
107. Guntupalli S., Jang S.E., Zhu T., Haganir R.L., Widagdo J., Anggono V. 2017. GluA1 subunit ubiquitination mediates amyloid- β -induced loss of surface α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *J. Biol. Chem.* **292**, 8186–8194.
108. Lehmann K., Steinecke A., Bolz J. 2012. GABA through the ages: regulation of cortical function and

- plasticity by inhibitory interneurons. *Neural Plast.* **2012**, 892784.
109. Allen K., Monyer H. 2014. Interneuron control of hippocampal oscillations. *Curr. Opin. Neurobiol.* **31**, 81–87.
 110. Cobb S.R., Buhl E.H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. 1995. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature.* **378**, 75–78.
 111. Aponte Y., Bischofberger J., Jonas P. 2008. Efficient Ca²⁺ buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* **586**, 2061–2075.
 112. Maccaferri G., Roberts J.D., Szucs P., Cottingham C.A., Somogyi P. 2000. Cell surface domain specific post-synaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.* **1** (524), 91–116.
 113. Orduz D., Bischofberger J., Schwaller B., Schiffmann S.N., Gall D. 2013. Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. *J. Physiol.* **591** (13), 3215–3232.
 114. Franconville R., Revet G., Astorga G., Schwaller B., Llano I. 2011. Somatic calcium level reports integrated spiking activity of cerebellar interneurons *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurophysiol.* **106** (4), 793–805.
 115. Cauli B., Audinat E., Lambolez B., Angulo M.C., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S., Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical non-pyramidal cells. *J. Neurosci.* **17** (10), 3894–3906.
 116. Collin T., Chat M., Lucas M.G., Moreno H., Racay P., Schwaller B., Marty A., Llano I. 2005. Developmental changes in parvalbumin regulate presynaptic Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci.* **25** (1), 96–107.
 117. Goldberg J.H., Tamas G., Aronov D., Yuste R. 2003. Calcium microdomains in aspiny dendrites. *Neuron.* **40**, 807–821.
 118. Goldberg J.H., Yuste R., Tamas G. 2003. Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: contribution of Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptors to subthreshold Ca²⁺ dynamics. *J. Physiol.* **551**, 67–78.
 119. Camiré O., Topolnik L. 2014. Dendritic calcium nonlinearities switch the direction of synaptic plasticity in fast-spiking interneurons. *J. Neurosci.* **34** (11), 3864–3877.
 120. Hainmuller T., Krieglstein K., Kulik A., Bartos M. 2014. Joint CP-AMPA and group I mGlu receptor activation is required for synaptic plasticity in dentate gyrus fast-spiking interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 13211–13216.
 121. Soler-Llavina G.J., Sabatini B.L. 2006. Synapse-specific plasticity and compartmentalized signaling in cerebellar stellate cells. *Nat. Neurosci.* **9**, 798–806.
 122. Lamsa K.P., Heeroma J.H., Somogyi P., Rusakov D.A., Kullmann D.M. 2007. Anti-hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science.* **315**, 1262–1266.
 123. Laezza F., Doherty J.J., Dingledine R. 1999. Long-term depression in hippocampal interneurons: Joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science.* **285**, 1411–1414.
 124. Lalanne T., Oyrer J., Mancino A., Gregor E., Chung A., Huynh L., Burwell S., Maheux J., Farrant M., Sjöström P.J. 2016. Synapse-specific expression of calcium-permeable AMPA receptors in neocortical layer 5. *J. Physiol.* **15**, 837–861.
 125. Зинченко В.П., Гайдин С.Г., Теплов И.Ю., Косенков А.М., Сергеев А.И., Долгачева Л.П., Тулеуханов С.Т. 2020. Визуализация, свойства и функции ГАМК-ергических нейронов гиппокампа, содержащих кальций-проницаемые киназные и AMPA-рецепторы. *Биол. мембраны.* **37** (1), 22–33.
 126. Chávez A.E., Singer J.H., Diamond J.S. 2006. Fast neurotransmitter release triggered by Ca influx through AMPA-type glutamate receptors. *Nature.* **443** (7112), 705–708.
 127. Xu J., Liu Y., Zhang G.Y. 2008. Neuroprotection of GluR5-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by Src kinase. *J. Biol. Chem.* **283** (43), 29355–29366.
 128. Valiullina F., Zakharova Y., Mukhtarov M., Draguhn A., Burnashev N., Rozov A. 2016. The relative contribution of NMDARs to excitatory postsynaptic currents is controlled by Ca²⁺-induced inactivation. *Front. Cell Neurosci.* **10**, 12.

Participation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors in Synaptic Plasticity

L. P. Dolgacheva^{1,*}, S. T. Tuleukhanov², V. P. Zinchenko^{1,**}

¹Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

*e-mail: dolgacheva@mail.ru

**e-mail: vpz@mail.ru

AMPA receptors are key molecules of excitatory and inhibitory synapses and are involved in synaptic plasticity. Cognitive functions of the brain, such as signal perception, processing and analysis of information, memorization, storage and exchange of information are reduced when the processes controlling the assembly of AMPA receptors, membrane trafficking and synapse-specific expression are impaired. The content of the receptors in synapses is regulated by exocytosis, endocytosis, and receptor recycling. Auxiliary subunits and

partners modulate the function of AMPA receptors. Ca^{2+} -permeable AMPA receptors (CP-AMPA) that do not contain the GluA2 subunit are involved in multiple forms of the synaptic plasticity, including long-term potentiation and depression, and play an important role in maintaining a right balance between excitation and inhibition in the brain. Activation of CP-AMPA in neurons provides a fast postsynaptic Ca^{2+} entry, which triggers the processes modifying the synapses' functioning through the interaction with other Ca^{2+} -transporting systems. The purpose of this review is to draw the attention of researchers to recent advances in the participation of CP-AMPA receptors in synaptic plasticity.

Keywords: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, glutamate receptors, interneurons, synapse, synaptic plasticity, long-term potentiation, auxiliary subunits, neurodegeneration, polyamines, polyamine block

УДК 576.382:616.155.34

ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ГАЛОГЕНИРУЮЩИЙ И КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС

© 2020 г. Л. Ю. Басырева^а, Е. В. Михальчик^а, А. К. Тихазе^б,
С. А. Гусев^а, В. З. Ланкин^б, О. М. Панасенко^{а, *}

^аФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ,
Москва, 121552 Россия

*e-mail: o-panas@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2019 г.

После доработки 06.07.2019 г.

Принята к публикации 07.07.2019 г.

Исследовано влияние модифицированных под действием активных форм галогенов (НОСl, НОВг) или активных форм карбониллов (глиоксаль, метилглиоксаль) липопротеинов низкой плотности (ЛНП) крови человека на нетоз. Показано, что 2-х часовая инкубация крови с ЛНП, модифицированными активными формами галогенов, вызывала зарегистрированный в мазках крови достоверный прирост количества нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), свидетельствуя об индукции нетоза. ЛНП, модифицированные карбонильными соединениями (глиоксальем или метилглиоксальем), в аналогичных условиях нетоз не вызывали. Анализ мазков крови показал, что количество нейтрофилов, а также их морфология не изменялись после инкубации крови с нативными ЛНП, а также с ЛНП, модифицированными указанными выше соединениями. Добавление в кровь ЛНП, модифицированных как под действием активных форм галогенов, так и карбониллов, не приводило к достоверному усилению хемилюминесценции в присутствии люминола. Если на фоне действия модифицированных ЛНП в инкубационную среду добавляли форбол-12-миристан-13-ацетат, то в ответ на него хемилюминесцентный сигнал увеличивался, но это увеличение достоверно не отличалось от контроля (на фоне нативных ЛНП). При менее продолжительной инкубации (инкубация ЛНП с кровью в течение 30 мин) ни нативные, ни модифицированные ЛНП нетоз не вызывали. Таким образом, нетоз, индуцируемый под действием ЛНП, модифицированных активными формами галогенов, по всей видимости, является медленным, кислороднезависимым, не сопровождающимся гибелью нейтрофилов процессом. Увеличение НВЛ в крови в результате развития галогенирующего стресса повышает вероятность образования микротромбов и нарушения микроциркуляции.

Ключевые слова: нетоз, нейтрофильные внеклеточные ловушки, липопротеины низкой плотности, активные формы галогенов, галогенирующий стресс, карбонильный стресс

DOI: 10.31857/S0233475520020024

ВВЕДЕНИЕ

Около 15 лет назад был описан новый механизм бактерицидного действия нейтрофилов, получивший название нетоз и заключающийся в

Список сокращений: МПО – миелопероксидаза; НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки; ЛНП – липопротеины низкой плотности; ЛНП-НОСl – ЛНП, модифицированные под действием НОСl; ЛНП-НОВг – ЛНП, модифицированные под действием НОВг; окЛНП – ЛНП, модифицированные в условиях окислительного стресса; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат.

том, что нейтрофилы после активации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры на основе ДНК, в которые встроены гистоны, а также белки гранулярного аппарата нейтрофилов: миелопероксидаза (МПО), эластаза, лактоферрин и др. [1]. Эти структуры получили название “нейтрофильные внеклеточные ловушки” (НВЛ). Первоначально их образование связывали с внеклеточной гибелью патогенов, т.е. с антимикробной защитой организма. Однако последующие исследования выявили их провос-

палительный потенциал и причастность к развитию целого ряда воспалительных заболеваний, таких как сепсис, васкулит, туберкулез и др. [2].

Липопротеины низкой плотности (ЛНП) плазмы крови человека, подвергнутые модификации в результате развития окислительного [3], карбонильного [4], галогенирующего [5] стресса, являются независимым фактором риска различных острых и хронических воспалительных заболеваний, в частности атеросклероза и сахарного диабета [6]. При развитии атеросклероза помимо поражения стенок магистральных сосудов развиваются патологические процессы с нарушением микроциркуляции [7]. Очевидно, что подобные события могут запускать образование локальных дефектов в различных органах и тканях, однако механизмы, благодаря которым модифицированные ЛНП вовлечены в повреждение микрососудов, понята далеко не полностью [8, 9]. Если нетоз развивается в сосудистом русле и НВЛ оказываются в крови, то они могут повреждать эндотелий сосудов, захватывать тромбоциты, тем самым служить основой для формирования тромбов и блокировать кровотоки в микрососудах [10–13].

Недавно было показано, что модифицированные в условиях моделирования окислительного стресса ЛНП (окЛНП) не только активируют нейтрофилы, что проявляется в усилении клетками продукции активных форм кислорода, их дегрануляции, но и стимулируют нетоз. Ингибитор МПО, гидразид 4-аминобензойной кислоты, снижал дегрануляцию и высвобождение НВЛ нейтрофилами, активированными под действием окЛНП. Это значит, что МПО выполняет роль важного медиатора при окЛНП-индуцированном нетозе [14].

Бактерицидная роль МПО обусловлена способностью этого фермента катализировать образование активных форм галогенов (НОСl, НОВr и др.), которые, будучи высоко реакционными соединениями, убивают патогены (бактерии, вирусы, грибы) [15]. В то же время действие этих низкомолекулярных соединений неспецифично. При чрезмерной их продукции нейтрофилами они могут повреждать биологически важные молекулы организма-хозяина (нуклеиновые кислоты, белки, липиды, антиоксиданты и др.), вызывая галогенирующий стресс [5, 16]. При этом модификации подвергаются и ЛНП. Ранее мы показали, что МПО сайт-специфично связывается с ЛНП и, продолжая функционировать, повреждает их поверхность посредством образования активных форм галогенов. Модифицированные таким образом ЛНП активируют нейтрофилы,

вызывая кислородный взрыв (продукцию активных форм кислорода) и дегрануляцию, что способствует дополнительному высвобождению из клеток МПО, усугубляет развитие галогенирующего стресса и замыкает порочный круг МПО-индуцированной модификации ЛНП [17–19].

Известно, что ряд заболеваний сопровождается накоплением в крови карбонильных соединений, способных модифицировать функциональные группы биологически важных молекул, в результате чего развивается карбонильный стресс [4]. Так, при автоокислении глюкозы у больных сахарным диабетом накапливаются такие альдегиды, как глиоксаль, метилглиоксаль, 3-дезоксиглюкозон. Реагируя с аминокетильными группами белка, они образуют внутри и межмолекулярные сшивки типа оснований Шиффа. Модифицированные такими карбонильными соединениями ЛНП эффективно поглощаются моноцитами-макрофагами, способствуя накоплению внутриклеточного холестерина, развитию атеросклероза [4], что может приводить к нарушению микроциркуляции.

До сих пор в научной литературе отсутствуют сведения о том, способны ли ЛНП, модифицированные в условиях галогенирующего или карбонильного стресса, влиять на нетоз аналогично тому, как это наблюдали ранее для окЛНП [14]. В настоящей работе мы исследовали влияние ЛНП, модифицированных активными формами галогенов (НОСl и НОВr) и карбонильными соединениями (глиоксальем и метилглиоксальем), на образование НВЛ. Поскольку функциональная активность изолированных нейтрофилов существенно отличается от их активности в цельной крови [20], мы проводили исследование нетоза в крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все соли, используемые в работе для приготовления буферных растворов, а также гипохлорит натрия (NaOCl), глиоксаль, метилглиоксаль, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), NaBr, EDTA, среда Кребса–Рингера были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США). В работе использовали красители эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду и азур-эозин по Романовскому фирмы ЭКОлаб (Россия).

Концентрацию NaOCl определяли по поглощению ОСГ при 290 нм и рН 12, считая молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [21]. Гипобромит натрия (NaOBr) получали путем смешивания равных объемов 1 мМ водных рас-

творов NaOCl и NaBr в течение 1 мин [22]. Принимая во внимание, что рК HOCl и HOBr составляет соответственно около 7.5 [21] и 8.7 [23] и при физиологических значениях pH часть кислот находится в молекулярной форме, а остальная часть – в виде аниона, далее под HOCl и HOBr мы будем понимать смеси HOCl/OCl⁻ и HOBr/OBr⁻, присутствующие в исследуемой среде.

ЛНП выделяли из плазмы донорской крови методом препаративного ультрацентрифугирования в градиенте плотности растворов NaBr [24]. Выделенные ЛНП диализовали против 10 мМ фосфатного буфера, содержащего 145 мМ NaCl (pH 7.4), в течение 15 ч при 4°C, сразу подвергали модификации и использовали в эксперименте.

Галогенирующий стресс моделировали путем инкубации ЛНП в присутствии HOCl или HOBr так, чтобы на одну частицу ЛНП приходилось 400 молекул окислителя. Для этого смешивали равные объемы 1.6 мМ HOCl (или HOBr) и 2 мг/мл ЛНП, что составляет ~4 мкМ по белку из расчета, что на одну частицу ЛНП приходится одна молекула апополипротеина В-100 с молекулярной массой 512 кДа. Инкубацию проводили при 37°C в течение 30 мин в 10 мМ фосфатном буфере, содержащем 145 мМ NaCl (pH 7.4).

Карбонильный стресс моделировали, инкубируя ЛНП в присутствии природных дикарбониллов: глиоксаля или метилглиоксаля. Для этого ЛНП инкубировали в PBS, pH 7.4 (из расчета 1 мкмоль дикарбонила на 100 мкг белка ЛНП) в течение 3 ч при 37°C. После завершения карбонильной модификации ЛНП диализовали против 2000 объемов того же буфера (PBS, pH 7.4) при 4°C в течение 18 ч. Концентрацию белка в ЛНП определяли по методу Лоури.

Образование НВЛ регистрировали в мазках цельной донорской крови, полученной в клинике ФНКЦ ФХМ ФМБА России в соответствии с требованиями этического комитета. Капиллярная кровь (из пальца) разводилась 3% водным раствором EDTA в соотношении 4 : 1 (по объему), 20 мкл такой крови для изготовления мазков и 20 мкл для анализа в камере Горяева помещали в пробирку (объемом 500 мкл), закрепляли в программируемом ротаторе-миксере Multi Bio Rs-24 (Biosan, Латвия) для предотвращения оседания клеток. Ротатор-миксер осуществлял возвратно-поступательные движения на угол 90° за 5 с с паузой между движениями 5 с. Инкубацию проводили при температуре 37°C. Через 1 ч после начала инкубации в каждый образец добавляли по 5 мкл модифицированных ЛНП. Конечная концентрация ЛНП в образцах составляла 200 мкг/мл

(по белку). В контрольные образцы добавляли либо 5 мкл нативных ЛНП с конечной концентрацией 200 мкг/мл (по белку), либо 5 мкл 10 мМ фосфатного буфера, содержащего 145 мМ NaCl (pH 7.4). Сразу после взятия крови, а также через 30 мин и 2 ч после начала инкубации в образцах определяли количество лейкоцитов в камере Горяева. Затем изготавливали стандартизированные мазки крови, фиксировали их по Май-Грюнвальду, окрашивали азур-эозином по Романовскому и на микроскопе Motic B3 (Motic, Hong Kong) проводили подсчет количества лейкоцитов и НВЛ [25]. Количественный анализ содержания НВЛ в 1 мкл крови проводился следующим образом. В средней части мазков крови подсчитывали общее число лейкоцитов и НВЛ. Зная количество лейкоцитов в 1 мкл крови, определенное в камере Горяева, рассчитывали количество НВЛ в 1 мкл крови.

Активацию нейтрофилов в цельной крови оценивали методом хемилюминесценции, как описано ранее [25]. Образцы крови для этих измерений готовили, как указано выше. В кровь добавляли нативные или модифицированные ЛНП (200 мкг/мл по белку), инкубировали 10–30 мин, разбавляли в 25 раз раствором Кребса–Рингера и вносили в кювету хемилюминометра (Lum-1200, ООО “ДИСофт”, Россия), содержащую люминол (200 мкМ). Измерение проводили в кинетическом режиме при 37°C и постоянном перемешивании в течение 10 мин, после этого добавляли ФМА до конечной концентрации 100 нМ, регистрируя интенсивность максимального сигнала хемилюминесценции в вольтах (В).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классический процесс формирования НВЛ (“суицидальный” нетоз), запускаемый бактериями, грибами или прямым действием ФМА на протеинкиназу С, является активным кислород-зависимым процессом, который развивается в течение нескольких часов и запускается при активации NADPH-оксидазы, что вызывает генерирование активных форм кислорода [26]. Ранее нами было показано, что если в эксперименте *ex vivo* цельная кровь инкубируется с ФМА (100 нМ), то в течение 2–3 ч появляются морфологические признаки активации нейтрофилов, регистрируется уменьшение их количества и увеличение числа НВЛ. При этом в крови регистрируется интенсивная люминол-зависимая хеми-

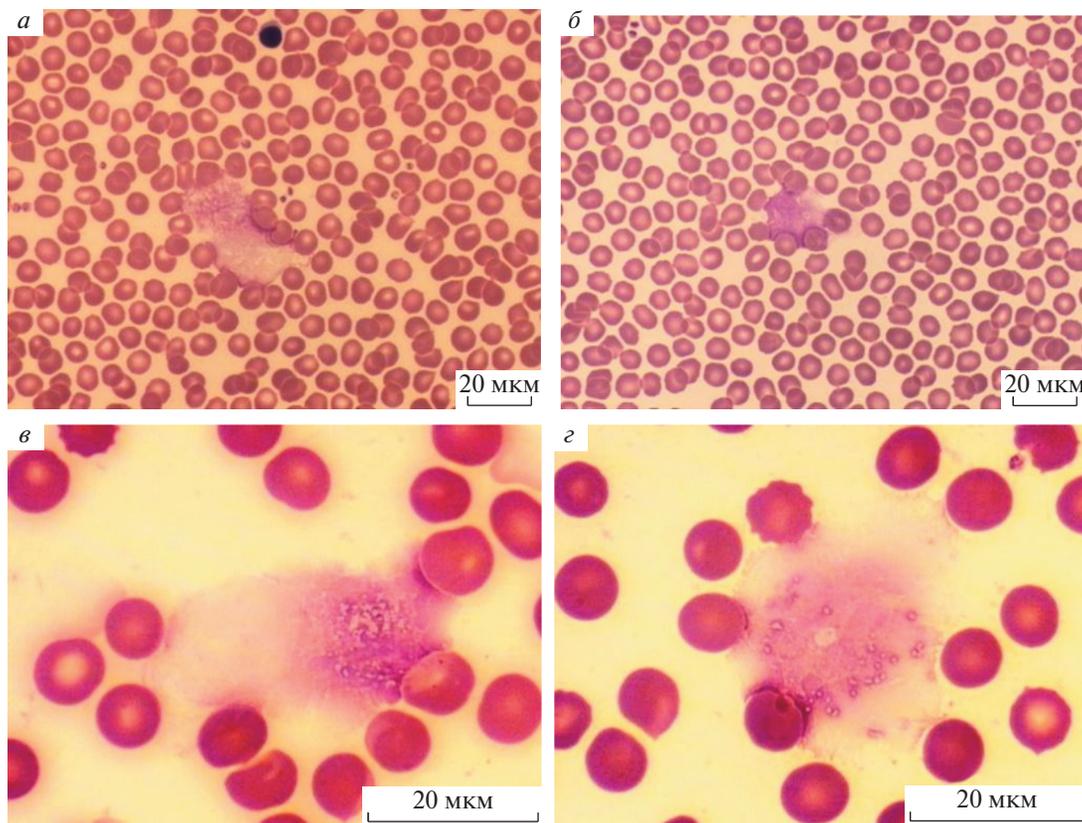


Рис. 1. Типичные примеры НВЛ на мазках крови до (а, в) и после (б, г) ее инкубации при комнатной температуре в течение 2 ч с ЛНП, модифицированными под действием НОСІ. Окраска по Романовскому. Длина маркера на фотографиях составляет 20 мкм.

люминесценция [25]. Описанные процессы находятся в хорошем соответствии с развитием событий при “суицидальном” нетозе [1, 26].

В настоящей работе мы оценили количество НВЛ, которое образуется через 2 ч после добавления модифицированных различным способом ЛНП в цельную кровь. Визуальный анализ мазков крови показал, что морфология нейтрофилов не менялась при инкубации в течение 2 ч с ЛНП, модифицированными как активными формами галогенов, так и активными формами карбониллов. Кроме того, не было замечено существенных различий в форме и размерах НВЛ до и после действия модифицированных ЛНП. В качестве примера на рис. 1 приведены типичные НВЛ до и после добавления в кровь ЛНП, модифицированных под действием НОСІ (ЛНП-НОСІ). В контрольных экспериментах было показано, что нативные ЛНП не вызывали прироста НВЛ в крови по сравнению с исходными значениями до инкубации с ЛНП. Результаты количественного анализа НВЛ представлены на рис. 2. Видно, что концентрация НВЛ в крови через 2 ч достоверно увеличивалась только после добавления в нее

ЛНП, модифицированных под действием НОСІ или НОВг (ЛНП-НОВг). Концентрация НВЛ после добавления в кровь ЛНП, модифицированных альдегидами (глиоксалем, метилглиоксалем), не изменялась. При этом, как видно из рис. 3, количество нейтрофилов в крови после инкубации со всеми типами модифицированных ЛНП достоверно не отличалось от контроля. Это говорит об отсутствии заметной гибели клеток при нетозе.

Активацию нейтрофилов в цельной крови после добавления к ней ЛНП оценивали методом хемилюминесценции в присутствии люминола. Оказалось, что добавление в кровь ЛНП, модифицированных как под действием активных форм галогенов, так и альдегидов, не приводило к достоверному усилению хемилюминесценции. Результаты экспериментов приведены в табл. 1. Если на фоне действия модифицированных ЛНП в инкубационную среду добавляли активатор (ФМА, 100 нМ), то в ответ на него хемилюминесцентный сигнал увеличивался, но это увеличение достоверно не отличалось от контроля (нативные ЛНП). Полученные результаты свидетельствуют о том, что модифицированные ЛНП сами по себе

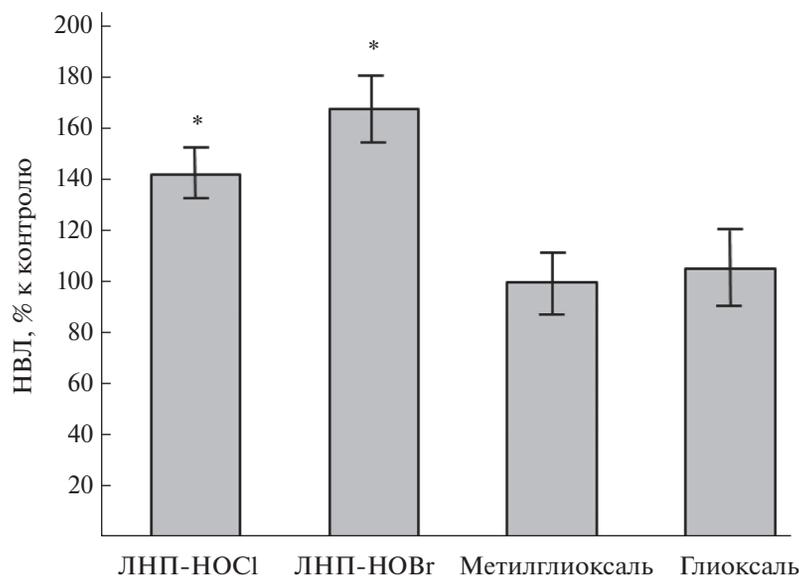


Рис. 2. Изменение концентрации НВЛ в крови после инкубации в течение 2 ч с модифицированными ЛНП в процентах к контролю (нативные ЛНП).

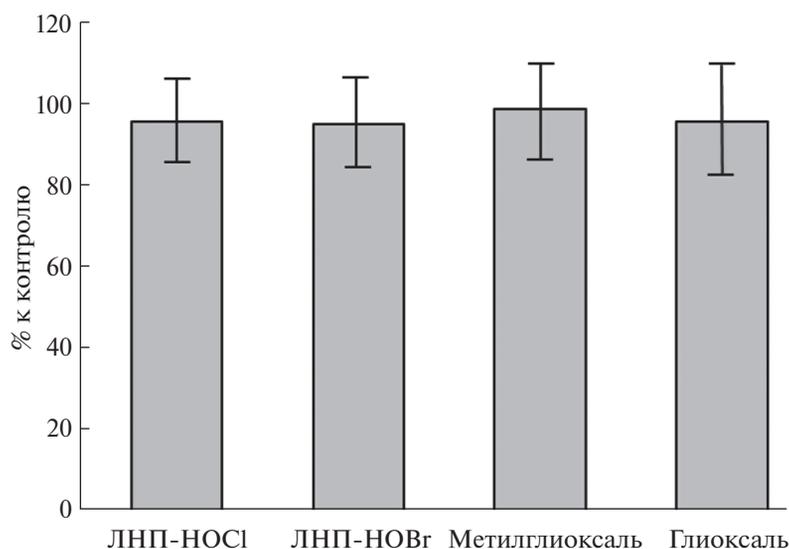


Рис. 3. Количество нейтрофилов в крови после инкубации в течение 2 ч с модифицированными ЛНП в процентах к контролю (нативные ЛНП).

не активируют NADPH-оксидазу нейтрофилов в цельной крови. Обнаружение хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на ФМА демонстрирует нормальное функциональное состояние клеток. Отсутствие разницы в интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов в составе крови в ответ на последующее добавление активатора говорит о том, что ЛНП, модифицированные как под действием активных форм галогенов, так и альдегидов, не обладают праймирующим действием в отношении NADPH-оксидазы нейтрофилов.

Таким образом, по сравнению с описанным нами ранее процессом формирования НВЛ в крови при действии ФМА [25] образование НВЛ после инкубации с ЛНП, модифицированными активными формами галогенов, характеризуется отсутствием изменений морфологии и количества нейтрофилов, а также ЛНП-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции. Это дает основание предполагать, что механизм образования НВЛ при действии на нейтрофилы ЛНП-НОСІ или ЛНП-НОВг отличается от инду-

Таблица 1. Интенсивность сигнала хемилюминесценции крови в присутствии люминола после добавления в нее нативных или модифицированных ЛНП (ХЛ1) и последующего ответа на ФМА (ХЛ2)

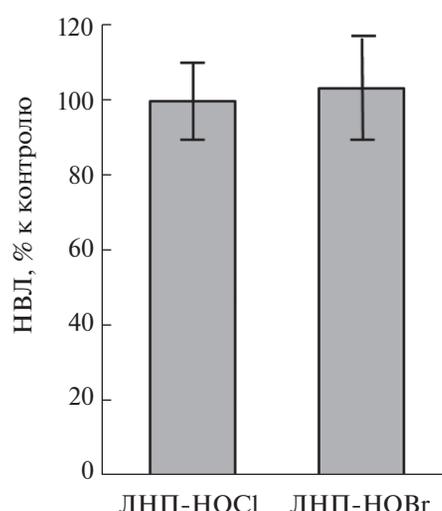
ЛНП	ХЛ1, В	ХЛ2, В
ЛНП (контроль)	1.7 ± 1.2	5.6 ± 0.4
ЛНП-НОС1	0.9 ± 0.4	5.6 ± 0.8
ЛНП-НОВг	1.0 ± 0.4	6.0 ± 2.3
ЛНП + метилглиоксаль	1.2 ± 0.5	4.2 ± 1.8
ЛНП + глиоксаль	1.6 ± 0.3	8.1 ± 1.3

цированного ФМА “суицидального” нетоза отсутствием заметной активации нейтрофилов и их гибели.

Ранее в ряде работ было показано, что в ответ на действие некоторых бактерий на нейтрофилы наблюдается особый тип образования НВЛ, получивший название “витального” нетоза. При реализации этого процесса НВЛ начинают формироваться очень быстро (уже через 5–10 мин), более того, образование НВЛ не зависит от активности NADPH-оксидазы, генерации активных форм кислорода и не заканчивается гибелью клетки [26]. Учитывая это, мы оценили изменение концентрации НВЛ через 30 мин после начала действия ЛНП, модифицированных активными формами галогенов. За это время “суицидальный” нетоз не успевает развиваться, а “витальный” уже должен себя проявить. Результаты исследова-

ния приведены на рис. 4. Оказалось, что за 30 мин инкубации цельной крови с ЛНП-НОС1 или ЛНП-НОВг не происходило достоверного изменения количества НВЛ в мазках. Мы также не наблюдали активации люминол-зависимой хемилюминесценции в крови в указанных условиях.

Полученные данные позволяют высказать несколько предположений. Ранее нами [27] и другими исследователями [28] отмечалось, что ЛНП-НОС1 активируют изолированные из крови нейтрофилы. В частности, они усиливают как люминол-, так и люцигенин-зависимую хемилюминесценцию клеток, увеличивают продукцию ими активных форм кислорода, дегрануляцию и адгезию нейтрофилов к эндотелию. Тем не менее, функциональный ответ на различные воздействия в отношении нейтрофилов, изолированных из крови, и в составе цельной крови существенно

**Рис. 4.** Количество НВЛ в мазках крови после инкубации в течение 30 мин с ЛНП-НОС1 и ЛНП-НОВг в процентах к контролю (нативные ЛНП).

отличается [20]. Оценка способности выделенных нейтрофилов генерировать НВЛ *in vitro* мало соотносится с реальными событиями в крови, поскольку при выделении нейтрофилов часть клеток теряется, удаляются белки и клетки, несущие на поверхности паттерн сиаловых кислот, тормозящий активацию нейтрофилов [20]. Все это затрудняет оценку значимости получаемых в экспериментах данных для рассмотрения вопросов, связанных с механизмами нарушения микроциркуляции. Таким образом, становится понятно, что особый интерес представляют прямые методы регистрации и расчетов количества НВЛ. Именно поэтому мы в своей работе проводили количественный анализ НВЛ на мазках крови. Достоинство этого подхода заключается в том, что помимо прямой регистрации количества НВЛ в цельной крови он может быть легко реализован в клинических условиях. Следует отметить, однако, что в крови присутствуют клетки, различные белки и низкомолекулярные соединения, способные тушить индуцированную хемилюминесценцию. Возможно, именно по этой причине нам не удалось зарегистрировать активацию хемилюминесценции нейтрофилов в цельной крови в ответ на добавление модифицированных ЛНП (табл. 1).

Вторая причина может быть связана с гетерогенностью популяции нейтрофилов [29]. Если в образование НВЛ при действии модифицированных активными формами галогенов ЛНП вовлекается лишь небольшое количество клеток, то для статистически достоверной регистрации изменения количества нейтрофилов и хемилюминесцентного ответа на ФМА чувствительности использованных методов может оказаться недостаточно. Наконец, нельзя исключить, что при действии ЛНП, модифицированных в условиях галогенирующего стресса, развивается ранее не описанный вариант медленного кислород-независимого нетоза. Проведенное исследование показало, что появление модифицированных активными формами галогенов ЛНП в крови способно активировать нетоз. Таким образом, увеличение НВЛ в крови в результате развития галогенирующего стресса повышает вероятность образования микротромбов, что может приводить к блокированию кровотока по микрососудам и нарушению микроциркуляции.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00530.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.

2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. **303**, 1532–1535.

2. Короткина О.Л., Генералов И.И. 2012. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции. *Иммунология, аллергология, инфектология*. **4**, 23–32.
3. Heinecke J.W. 2003. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **91** (3A), 12A–16A.
4. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. 2007. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессе. *Биохимия*. **72**, 1330–1341.
5. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. 2010. Галогенирующий стресс и его биомаркеры. *Вестник Российской АМН*. (1), 27–39.
6. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. 2017. Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research. *Curr. Aging Sci.* **10** (1), 18–25.
7. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. 1983. *Холестериноз*. М.: Медицина. 352 с.
8. Liao L., Granger D.N. 1996. Role of mast cells in oxidized low-density lipoprotein-induced microvascular dysfunction. *Am. J. Physiol.* **271** (5), H1795–H1800.
9. Lubrano V., Balzan S. 2016. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvascular Research*. **105**, 132–140.
10. Handono K., Sidarta Y.O., Pradana B.A., Nugroho R.A., Hartono I.A., Kalim H., Endharti A.T. 2014. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Med. Indones.* **46** (3), 189–198.
11. Fadini G.P., Menegazzo L., Scattolini V., Gintoli M., Albiero M., Avogaro A. 2016. A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **26** (1), 1–8.
12. Thålin C., Demers M., Blomgren B., Wong S.L., von Arbin M., von Heijne A., Laska A.C., Wallén H., Wagner D.D., Aspberg S. 2016. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb. Res.* **139**, 56–64.
13. de Bont C.M., Boelens W.C., Puijn G.J.M. 2019. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol. Immunol.* **16** (1), 19–27.
14. Awasthi D., Nagarkoti S., Kumar A., Dubey M., Singh A.K., Pathak P., Chandra T., Barthwal M.K., Dikshit M. 2016. Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils via TLR-ПКC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation. *Free Radic. Biol. Med.* **93**, 190–203.

15. Klebanoff S.J. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 598–625.
16. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. 2013. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биол. химии.* **53**, 195–244.
17. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Pulina M.O., Zakharova E.T., Prozorovskii V.N., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. 2010. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin. *Chem. Phys. Lipids.* **163**, 347–355.
18. Sokolov A.V., Chekanov A.V., Kostevich V.A., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. 2011. Revealing binding sites for myeloperoxidase on the surface of human low density lipoproteins. *Chem. Phys. Lipids.* **164**, 49–53.
19. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Runova O.L., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M. 2014. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase. *Chem. Phys. Lipids.* **180**, 72–80.
20. Lizcano A., Secundino I., Döhrmann S., Corriden R., Rohena C., Diaz S., Ghosh P., Deng L., Nizet V., Varki A. 2017. Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation. *Blood.* **129** (23), 3100–3110.
21. Morris J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5° to 35°. *J. Phys. Chem.* **70**, 3798–3805.
22. Margerum D.W., Kumar K. 1987. Kinetics and mechanism of general – acid – assisted of bromide by hypochlorite and hypochlorous acid. *Inorg. Chem.* **26**, 2706–2711.
23. Gazda M., Margeum D.W. 1994. Reactions of monochloramine with Br₂, Br₃⁻, HOBr, and OBr₂⁻: Formation of bromochloramines. *Inorg. Chem.* **33**, 118–123.
24. Lindgren F.T. 1975. Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. In: *Analysis of lipids and lipoproteins*. Ed. Perkins E.G. Champaign (Ill.): Amer. Oil Chemists Society, p. 204–224.
25. Basyreva L.Y., Brodsky I.B., Gusev A.A., Zhapparova O.N., Mikhailchik E.V., Gusev S.A., Shor D.B., Dahan S., Blank M., Shoenfeld Y. 2016. The effect of Intravenous Immunoglobulin (IVIG) on \textit{ex vivo} activation of human leukocytes. *Hum. Antibodies.* **24** (3-4), 39–44.
26. Yipp B.G., Kubes P. 2013. NETosis: How vital is it? *Blood.* **122** (16), 2784–2794.
27. Панасенко О.М., Михальчик Е.В., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н. 2016. Влияние антиоксидантов и сквенджеров гипогалоидных кислот на активацию нейтрофилов липопротеинами низкой плотности, модифицированными гипохлоритом. *Биофизика.* **61** (3), 500–509.
28. Kopprasch S., Leonhardt W., Pietzsch J., Kühne H. 1998. Hypochlorite-modified low-density lipoprotein stimulates human polymorphonuclear leukocytes for enhanced production of reactive oxygen metabolites, enzyme secretion, and adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis.* **136**, 315–324.
29. Mortaz E., Alipoor S.D., Adcock I.M., Mumby S., Koenig L. 2018. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front. Immunol.* **9**, 2171. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02171>

Neutrophil Extracellular Trap Formation in Whole Blood Caused by Low Density Lipoproteins Modified under Conditions Mimicking Halogenative and Carbonyl Stress

L. Y. Basyreva¹, E. V. Mikhailchik¹, A. K. Tikhaze², S. A. Gusev¹,
V. Z. Lankin², O. M. Panasenko^{1,*}

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435 Russia

²National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, 121552 Russia

*e-mail: o-panas@mail.ru

We studied the effect of human blood low density lipoproteins (LDL) modified by reactive halogen species (HOCl, HOBr) or reactive carbonyl species (glyoxal, methylglyoxal) on NETosis. A 2-h incubation of blood with LDL modified by reactive halogen species led to a significant increase in the number of neutrophil extracellular traps (NETs), as observed in blood smears, indicating the induction of NETosis. Such an effect was not found for LDL modified by carbonyl compounds (glyoxal or methylglyoxal). Examination of blood smears showed that the number and morphology of neutrophils were not changed after incubation with native LDL or LDL modified by the above compounds. The addition to blood of LDL modified by reactive halogen species, as well as by carbonyls, caused no significant increase in blood luminol-dependent chemiluminescence. When following modified LDL, a cell activator (phorbol-12-myristate-13-acetate) was added to the blood, the chemiluminescence signal increased but did not differ significantly from that for control (native)

LDL. At an earlier time (30 min) of blood incubation with LDL, neither native nor modified LDL showed activating effect on NETosis. Consequently, NETosis induced by LDL modified by reactive halogen species is apparently a slow, oxygen-independent process not accompanied by neutrophil death. An elevated level of circulating NETs in response to halogenative stress increases the likelihood of microthrombus formation and disturbance of the microcirculation.

Keywords: NETosis, neutrophil extracellular traps (NETs), low density lipoproteins, reactive halogen species, halogenative stress, carbonyl stress

УДК 576.31

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ

© 2020 г. Д. И. Дергачева^а, О. И. Кляйн^б, А. А. Мариничев^{а, б}, Н. Н. Гесслер^а,
В. В. Теплова^с, Е. П. Исакова^а, Ю. И. Дерябина^{а, *}

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бМосковский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия

^сИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: yul_der@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2019 г.

После доработки 17.09.2019 г.

Принята к публикации 23.09.2019 г.

Исследовано влияние природных полифенолов (ресвератрола (РСВ), дигидромирицетина (ДГМ), пиносильвина (ПС), эпигаллокатехина (ЭГК), мирицетина и дигидрокверцетина (ДГК)) на скорость генерации перекиси водорода митохондриями печени крыс при развитии токсического повреждения печени, индуцированного гепатотропным ядом тиоацетамидом. Показано, что все исследованные полифенолы в концентрации 10 мкМ оказывали антиоксидантное действие при развитии окислительного стресса в митохондриях печени крыс с токсическим гепатитом, снижая скорость роста флуоресцентного сигнала зонда Amplex Red с эффективностью: РСВ > мирицетин > ДГК > ДГМ > ПС > ЭГК. Все протестированные полифенолы оказывали незначительное влияние на уровень продукции свободных радикалов в митохондриях печени контрольных животных. Исследование антиоксидантной активности полифенолов показало, что в условиях неспецифической Ca²⁺-зависимой пермеабиллизации митохондриальной мембраны в присутствии ионов Ca²⁺ и неорганического фосфата в митохондриях контрольных животных полифенолы вызывали выраженное уменьшение скорости генерации перекиси: 2-кратное в случае ДГМ, ПС и ЭГК, 3-кратное в случае РСВ, 3.7-кратное и 5-кратное для ДГК и мирицетина соответственно. В митохондриях, изолированных из печени животных с индуцированной патологией, исследованные полифенолы также вызывали существенное снижение скорости генерации АФК. Наиболее эффективное действие оказывали ДГК, ПС и ДГМ, снижающие скорость продукции АФК в среднем в 5.3, 2.8 и 2.4 раза соответственно. Представленные данные демонстрируют, что в условиях клеточной патологии природные полифенолы оказывают мощное антиоксидантное действие, в то время как в физиологических условиях эти соединения могут оказывать либо нейтральный, либо даже мягкий прооксидантный эффект. Полученные данные могут быть применены для разработки новых потенциальных фармакологических препаратов природного происхождения для предотвращения развития и лечения распространенных заболеваний, в основе которых лежат митохондриальные патологии.

Ключевые слова: полифенолы, антиоксиданты, митохондрии, токсический гепатит

DOI: 10.31857/S023347520020036

ВВЕДЕНИЕ

Полифенолы составляют большую группу биоактивных фитохимических веществ, которые включают множество подклассов, таких как флавоноиды, стильбены, фенольные кислоты и лигнаны [1]. Полифенолы растительного происхождения являются одним из наиболее активно используемых в молекулярной медицине типов антиоксидантов [2]. Они обладают умеренной

гидрофобностью, позволяющей им при определенных условиях проникать через клеточные мембраны и другие барьеры. Некоторые полифенолы несут заряженные группы, позволяющие им менять степень гидрофобности в зависимости от значения pH. Полифенолы активно взаимодействуют с липидами различных клеточных мембран, в том числе, плазматической и митохондриальной, изменяя их латеральную текучесть и проницаемость [3]. Особое внимание исследо-

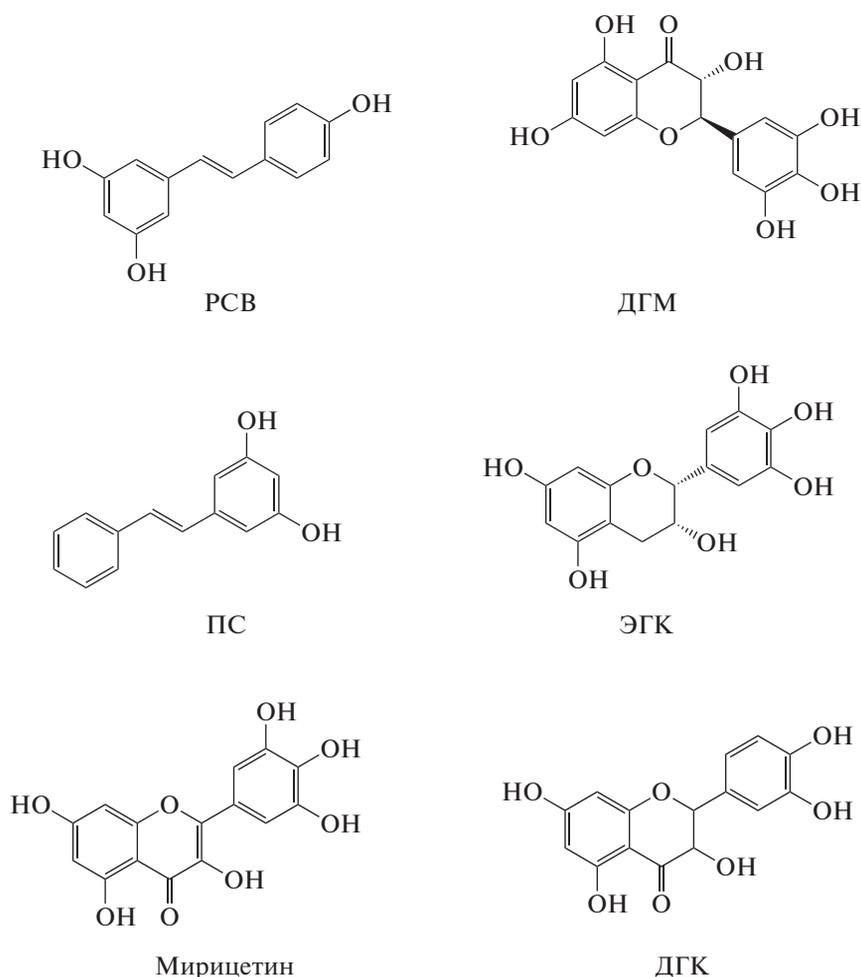


Рис. 1. Структурные формулы полифенолов: РСВ, ДГМ, ПС, ЭГК, мирицетин, ДГК.

вателей к этим классам соединений обусловлено уникальными антиоксидантными, противовоспалительными, антимикробными, гепато- и кардиопротекторными, антиканцерогенными и антидиабетическими свойствами, которые проявляют отдельные их представители. Являясь природными соединениями с одной или несколькими гидроксильными группами, присоединенными к бензольному кольцу, эти вещества обладают способностью захватывать свободные радикалы и таким образом реализовывать свои антиоксидантные свойства [4] (рис. 1). Наиболее заметное влияние полифенолы оказывают на клетки, обладающие увеличенной способностью к генерации активных форм кислорода (АФК): нейтрофилы, клетки макрофагального ряда миелоцитоидного типа и клетки, подвергшиеся малигнизации [3]. Наряду с антиоксидантной активностью некоторые полифенолы способны специфически взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток, различными внутриклеточными ферментами (в том числе, из состава

дыхательных комплексов митохондрий) и мембранными ионными каналами (транспортёрами) [3].

Растительные полифенолы оказывают влияние и на функции митохондрий. Было обнаружено, что проантоцианидины экстракта из виноградной косточки могут смягчать дисфункцию митохондрий, индуцированную пероксидом водорода, за счет поддержания мембранного потенциала, работы цепи переноса электронов и подавления продукции кислородных радикалов митохондриями [5]. Вальдекантос и соавт. [6] описали уменьшение продукции АФК митохондриями печени крыс на фоне увеличения активности митохондриальной Mn-супероксиддисмутазы и уменьшения активности глутатионпероксидазы под действием наиболее изученного природного полифенола ресвератрола (РСВ). Другие авторы [7] сообщили об уменьшении продукции перекиси водорода и снижении скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 под действием РСВ, однако точный механизм этого явления не был объяснен.

Было обнаружено, что изофлавоноид гесперидин также оказывал положительное действие на активность комплексов I–IV дыхательной цепи митохондрий Т-клеток мышей [8]. Однако помимо позитивного воздействия на функции митохондрий, был отмечен и противоположный эффект полифенолов на эти органеллы, связанный с общим нарушением биоэнергетики и запуском апоптических реакций [9]. В частности, Зини и соавт. [10] обнаружили, что РСВ способен ингибировать поглощение кислорода в изолированных митохондриях мозга, связанное с ингибированием участка между комплексами I и III. В работе [11] авторы констатировали блокирование РСВ АТФ-азной активности в митохондриях мозга и печени, предположив, что это связано с взаимодействием соединения с субъединицей F1 ферментного комплекса. Морейра и соавт. [12] доложили как о прооксидантном, так и об антиоксидантном действии РСВ на изолированные митохондрии мозга и печени у крыс обоих полов. В то же время было показано, что некоторые прооксидантные эффекты полифенола могут запускать стимуляцию антиоксидантной защиты клеток через сигнальные пути, включающие ядерные факторы (erythroid-derived 2)-like 2 (ARE/Nrf2) и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназу/Akt (PI3K/Akt) [12].

Перечисленные разнонаправленные функции полифенолов приводят к тому, что их поведение в организме оказывается во многом непредсказуемым: оно зависит не только от структуры полифенола, но и от дозы, пути введения, состояния иммунной и других систем организма. Многочисленные исследования фармакокинетики полифенолов привели лишь к пониманию чрезвычайной сложности этой проблемы, но не к разработке концепции применения этих соединений. Точный механизм, посредством которого природные полифенолы моделируют функции и динамику митохондрий, остается неизвестным.

В представленной работе мы использовали модель хронической интоксикации экспериментальных животных гепатотоксикантом тиоацетамидом (ТАА), обуславливающим тяжелые изменения в тканях печени и возникновение гипергаммониемии [13]. Выбор этой экспериментальной модели был обусловлен доказанной для эффекта ТАА на животных моделях патологической картиной, включающей в себя ингибирование сукцинатдегидрогеназной активности, коллапсирование мембранного потенциала, набухание митохондрий и возрастание уровня АФК [13]. Хроническое администрирование ТАА провоцирует индуцированную гипергаммониемией обширную митохондриальную дисфункцию и клеточный энергетический дефицит. Поскольку природные полифенолы являются эффективными антиоксидантами, мы сочли крайне интерес-

ным исследовать их эффекты на модели с выраженным развитием окислительного стресса.

Целью данной работы являлось исследование влияния природных полифенолов: РСВ, дигидромирицетина (ДГМ), пиносильвина (ПС), эпигаллокатехина (ЭГК), мирицетина и дигидрокверцетина (ДГК) – на уровень окислительного стресса, индуцированного в митохондриях печени крыс при развитии экспериментальной печеночной патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах белых крыс линии *Wistar* в соответствии с международными требованиями для медико-биологических экспериментов на животных, одобренными комиссией по биомедицинской этике ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН. Крысы весом 120–140 г были разделены на 2 группы, по 8–10 животных в каждой группе: 1 – контрольные животные, которые содержались на обычном пищевом рационе вивария; 2 – животные с индуцированным токсическим гепатитом (группа печеночной патологии, ПП).

Для индукции токсического повреждения печени и развития печеночной патологии животным ежедневно алиментарным путем вводили водный 0.05% раствор гепатотоксиканта ТАА, который показал высокую эффективность при разработке модели ПП [14, 15]. Введение ТАА животным начинали с концентрации 0.015% ТАА, повышая в течение трех дней до рабочей концентрации (0.05% ТАА). Через 10 дней животных вывели из эксперимента и немедленно после вскрытия проводили отбор крови для биохимических исследований и образцов печени крыс контрольной и ПП групп. Развитие токсического гепатита оценивали по динамике веса животных, изменению биохимических параметров крови (билирубина, общего белка и глюкозы) и гистологическим изменениям печени. Образцы сыворотки крови исследовали на биохимическом анализаторе на содержание белка, глюкозы, прямого билирубина и активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Биохимический анализ крови экспериментальных животных выполняли на базе независимой ветеринарной лаборатории “ШансБио”. Лаборатория является участником Международной системы внешнего контроля качества лабораторных исследований EQAS (Bio-Rad, США) (код участника 9471) и Федеральной системы внешнего контроля качества лабораторных исследований МЗ РФ ФСВОК (код участника 10705).

Из печени крыс контрольной и ПП групп выделяли митохондрии методом дифференциального центрифугирования [16]. Осадок митохон-

дрий ресуспендировали в среде промывания митохондрий (60 мг в мл) и хранили на льду до использования в эксперименте. Определение белка в препаратах митохондрий проводили по методу Брэдфорд с Кумасси G-250 [17].

Для оценки уровня АФК при помощи флуоресцентного красителя Amplex Red (AR) (стоковый 10 мМ раствор в ДМСО) митохондрии добавляли в среду для исследования дыхательной активности, содержащую 210 мМ маннит; 70 мМ сахарозу; 10 мМ HEPES-Na, pH 7.4; 0.2 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$; 5 мМ сукцинат; 1 мкМ ротенон, 0.5 мг/мл митохондриального белка. Затем разносили митохондриальную суспензию по лункам 96-луночного иммунологического планшета для флуоресцентных исследований. Туда же вносили экспериментальные образцы полифенолов в конечной концентрации 10 мкМ (стоковый 1 мМ раствор в ДМСО), после чего добавляли Amplex Red (Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, Sigma) в конечной концентрации 25 мкМ. Реакцию запускали внесением в реакционную среду пероксидазы хрена ($RZ = 0.6 = 150-170$ ед/мг), применяя стоковый раствор с концентрацией 1 мг / 5 мл. Измерение флуоресценции в длине волны $\lambda 590 \pm 25$ нм при возбуждении $\lambda 530 \pm 35$ нм проводили на фотометре-флуориметре Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader Biotek (США). Измерения проводили в течение 15 мин с последующим анализом данных в программе Microsoft Excel. Динамика скорости продукции перекиси носила нелинейный характер в течение первых 10 мин детекции за счет развития максимального уровня флуоресценции, достигая плато к 15 мин, поэтому уровень флуоресценции AR в относительных единицах был оценен через 15 мин инкубации митохондрий в контроле или инкубированных с полифенолами. Этот показатель был соотнесен с уровнем флуоресценции AR, регистрируемым после добавления свежеприготовленного раствора перекиси водорода (100 нмоль/мл). Это было сделано для разных групп животных (контрольной и с индуцированной ПП) и разных условий эксперимента (инкубации в нормальных физиологических условиях и в условиях индукции Ca^{2+} -зависимой неспецифической поры – в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} и 2 мМ P_i). На основании полученных данных, с учетом времени измерения (15 мин) и количеством белка в пробе (0.5 мг/мл), были проведены вычисления скоростей образования перекиси водорода.

Данные представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Достоверность в разнице полученных данных определяли по методике непарного *t*-теста. Значение $p \leq 0.05$ считалось достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации развития ПП была оценена динамика физиолого-биохимических показателей крови экспериментальных животных при введении гепатотоксиканта ТАА через 10 сут после начала эксперимента. Были определены следующие параметры: билирубин прямой, АСТ, АЛТ, общий белок и глюкоза. Данные, представленные в табл. 1, продемонстрировали, что при интоксикации ТАА уровень билирубина увеличился более чем в 12 раз в ходе развития ПП, что ярко свидетельствовало о развитии патологии печени. Наряду с этим, уровни общего белка и глюкозы в крови животных исследуемых групп практически не отличались (табл. 1). Уровень активности фермента АЛТ достоверно уменьшался на 30% по отношению к контрольной группе, в то время как активность АСТ возрастала примерно на 14% (табл. 1). Общеизвестно, что АЛТ содержится во многих органах человека и животных: почках, сердечной мышце, печени и скелетной мускулатуре. Основная функция этого фермента, катализирующего обратимый перенос аминокислотной группы аланина на α -кетоглутарат, заключается в обмене аминокислот. В результате переноса аминокислотной группы образуются глутаминовая и пировиноградная кислоты. Таким образом, посредством АЛТ реализуется получение энергии для работы головного мозга и центральной нервной системы. В тесном взаимодействии с АЛТ работает фермент АСТ, который также синтезируется внутриклеточно. Уровень АСТ резко повышается на поздних стадиях заболевания печени, таких как цирроз, что и наблюдалось в наших исследованиях (табл. 1). Соотношение АСТ к АЛТ характеризует коэффициент де Ритиса [18]. Расчет этого показателя в наших исследованиях показал, что в контрольной группе он составлял 3.01, а в группе, получающей гепатотоксикант – 5.0 (табл. 1), что свидетельствовало о нарушении функции печени. Таким образом, через 10 дней введения гепатотоксиканта ТАА испытуемым животным наблюдались выраженные симптомы патологии печени.

Для оценки антиоксидантной активности исследуемых полифенолов с помощью флуоресцентного зонда AR было проведено исследование их действия на скорость генерации пероксида водорода митохондриями печени крыс контрольных животных и животных с индуцированной ПП. На рис. 2а представлены оригинальные кривые флуоресценции AR в митохондриях печени с индуцированной патологией, как без добавок полифенолов, так и с добавками ДГМ (10 мкМ) и РСВ (10 мкМ). Выбор концентраций был обусловлен литературными данными, полученными на аналогичных экспериментальных объектах. Как видно, в контрольном варианте (без добавки полифе-

Таблица 1. Биохимические показатели крови контрольных животных и животных с индуцированной печеночной патологией (группа ПП)

Группа животных	Билирубин прямой, мкмоль/л	АСТ	АЛТ	Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л
		ед/л			
Контроль	0.4 ± 0.1	238 ± 2.1	79.0 ± 4.2	68.0 ± 10.9	6.75 ± 0.54
Группа ПП	4.9 ± 0.4	276 ± 3.2	55.5 ± 9.3	65.5 ± 4.4	6.51 ± 0.38

нолов) уровень флуоресценции составлял 400–450 усл. ед., причем этот параметр планомерно возрастал в ходе проведения измерений (15 мин) (рис. 2а, кривая 1). Внесение ДГМ и РСВ снижало уровень флуоресценции более чем в 2 и 4 раза, соответственно (рис. 2а, кривые 2, 3). Кроме того, в случае РСВ происходила стабилизация сигнала на одинаково низком уровне в ходе всего времени проведения эксперимента (рис. 2а, кривая 3). На рис. 2б представлены данные по влиянию всех исследованных полифенолов на скорость генерации перекиси водорода *in vitro* митохондриями печени крыс контрольной группы (серые столбики) и митохондриями печени крыс с ПП (белые столбики).

Митохондрии печени животных, получавших гепатотоксикант в течение 10 дней, характеризовались более чем 2-кратным увеличением скорости генерации АФК, по сравнению с митохондриями печени животных контрольной группы. Внесение полифенолов РСВ, ДГМ, ПС, ЭГК, мирицетина и ДГК в концентрации 10 мкМ в митохондриальную суспензию, полученную из печени животных группы ПП, приводило к уменьшению продукции АФК в 3.4, 1.6 и 1.7 раз для РСВ, ПС и ДГМ, соответственно. ЭГК, мирицетин и ДГК уменьшали этот параметр в 1.2, 2.5 и 2.3 раза, соответственно (рис. 2б). Таким образом, эффективность действия полифенолов может быть представлена следующим рядом: РСВ > мирицетин > ДГК > ДГМ > ПС > ЭГК. В то же время все протестированные полифенолы не оказывали существенного влияния на уровень продукции свободных радикалов в митохондриях печени контрольных животных, за исключением вариантов с РСВ и мирицетином, где наблюдалось незначительное уменьшение флуоресцентного сигнала. Это наблюдение можно объяснить специфическим антиоксидантным действием этих полифенолов на уровень митохондриальных АФК (рис. 2б).

Увеличение концентрации свободного Ca^{2+} в матричном пространстве митохондрий млекопитающих в присутствии целого ряда веществ-индукторов приводит к возникновению неспецифической проницаемости внутренней мембраны, обусловленной открытием Ca^{2+} -зависимой белковой поры (mitochondrial permeability transition pore, РТР) [19]. В патологических условиях (окислительный стресс, истощение внутримитохон-

дриального пула адениновых нуклеотидов и др.) эта неспецифическая циклоспорин А-зависимая пора открывается и вызывает широкое освобождение накопленного Ca^{2+} , падение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и высокоамплитудное набухание митохондрий [20, 21]. Открытие РТР может рассматриваться как один из путей эффективного вывода катиона в условиях высоких нагрузок цитоплазматического Ca^{2+} [21, 22]. Имеются убедительные доказательства участия РТР митохондрий в запуске ключевых реакций апоптоза [23]. В настоящей работе было исследовано влияние полифенолов на скорость генерации АФК в условиях неспецифической Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации мембраны в присутствии Ca^{2+} и неорганического фосфата (P_i), который является мощным стимулятором поры. На рис. 3 представлены данные по влиянию всех исследованных полифенолов на скорость генерации перекиси водорода *in vitro* митохондриями печени крыс контрольной группы (серые столбики) и митохондриями печени крыс с ПП (белые столбики). В условиях Ca^{2+} -зависимого развития неспецифических нарушений митохондриальной мембранной проницаемости в присутствии индукторов поры в митохондриях контрольной группы скорость генерации АФК увеличивалась в среднем в 2.7 раза, в то время как органеллы, изолированные из печени группы ПП, демонстрировали возрастание скорости образования перекиси в среднем в 3.8 раз (рис. 3). Кроме того, скорость образования АФК в митохондриях группы ПП в среднем в 2.8 раз превосходила этот параметр у контрольных органелл (рис. 3). Интересно отметить, что в митохондриях контрольных животных полифенолы вызывали более выраженное уменьшение скорости генерации перекиси: 2-кратное в случае ДГМ, ПС и ЭГК, 3-кратное в случае РСВ, 3.7-кратное и 5-кратное для ДГК и мирицетина, соответственно (рис. 3). В митохондриях, изолированных из печени животных с индуцированной патологией, исследованные полифенолы также вызывали существенное снижение скорости генерации АФК. Наиболее эффективное действие оказывали ДГК, ПС и ДГМ, снижающие скорость продукции АФК в среднем в 5.3, 2.8 и 2.4 раза соответственно. Исключение составил РСВ, который практически не влиял (или влиял очень слабо) на скорость генерации АФК (рис. 3).

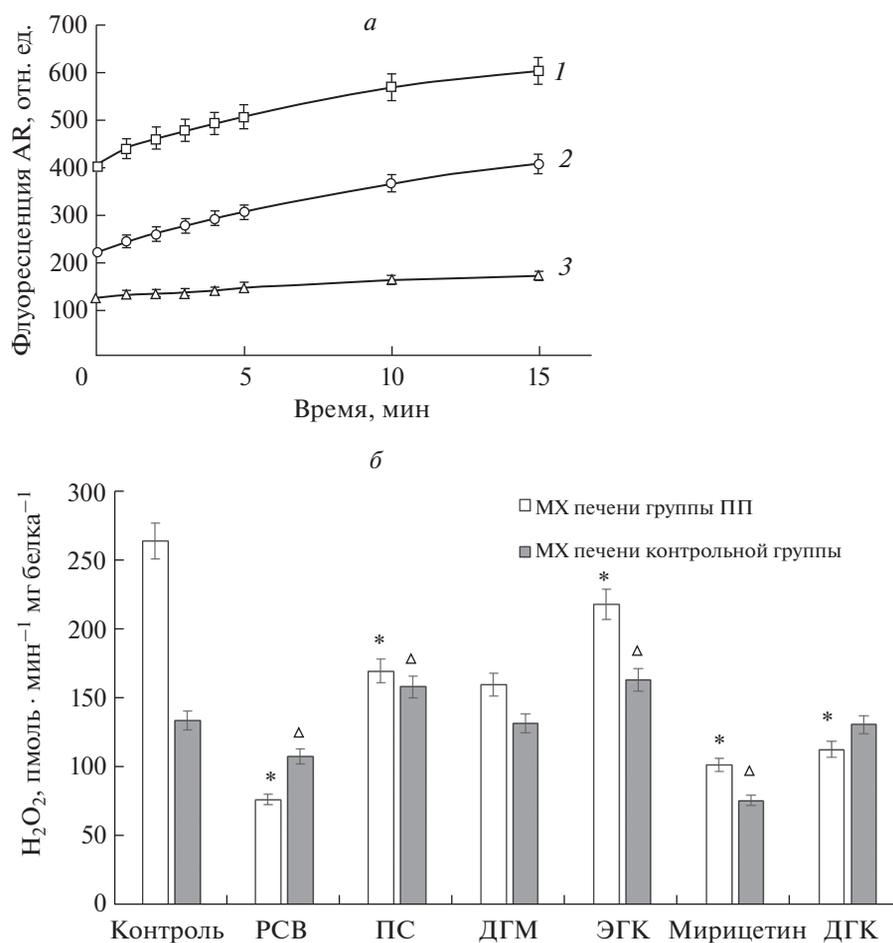


Рис. 2. Влияние полифенолов на скорость генерации АФК (перекиси водорода) *in vitro* митохондриями печени крыс контрольных животных и животных с индуцированной патологией печени. На панели *а* представлены оригинальные кривые флуоресценции АР в митохондриях печени с индуцированной патологией, как без добавок полифенолов (1), так и с добавками ДГМ (2) и РСВ (3); на панели *б* представлены данные по влиянию полифенолов на продукцию перекиси водорода в митохондриях печени крыс контрольной группы (серые столбики) и данные по влиянию полифенолов на продукцию перекиси водорода в митохондриях печени крыс, с индуцированной гепатотоксичностью (белые столбики). Столбики, подписанные “контроль”, обозначают контроль для каждой группы животных без действия полифенолов. Данные по действию полифенолов сравниваются с “контролем” внутри каждой группы. Все полифенолы вносили в концентрации 10 мкМ. Приведены данные 3–5 независимых экспериментов. На панели *б*: * – статистически значимые различия между генерацией H₂O₂ митохондриями печени крыс группы ПП без добавления полифенолов (контроль) и данными по действию полифенолов на генерацию H₂O₂ митохондриями печени этой группы. Δ – статистически значимые различия между генерацией H₂O₂ митохондриями печени крыс контрольной группы без добавления полифенолов (контроль) и данными по действию полифенолов на генерацию H₂O₂ митохондриями печени этой группы.

Митохондриальная дисфункция является ключевым событием патогенетического звена широкого круга заболеваний, включая метаболический синдром, различные печеночные патологии, сердечно-сосудистые и неврологические расстройства. Дисбаланс между образованием АФК и их нейтрализацией приводит к гиперпродукции АФК с соответствующим снижением синтеза АТФ и нарушением всех других функций митохондрий. Высокая концентрация Ca²⁺ создает условия для дополнительной генерации АФК. Поиск агентов, предотвращающих избыточную продукцию АФК митохондриями и способствующих

снижению митохондриальной патологии, остается чрезвычайно востребованным направлением исследований. К настоящему времени установлено, что ряд полифенолов оказывают положительное действие на функции митохондрий [3]. Так, обладающий свойствами антиоксиданта РСВ стимулирует экспрессию гена *sirt1* и улучшает окисление жирных кислот в митохондриях в условиях дефицита карнитинпальмитилтрансферазы 2 [24]. Положительное влияние на функции митохондрий как в системе *in vitro*, так и в опытах *in vivo* наряду с РСВ оказывает также природный полифенол мирицетин [8, 25]. Проявля-

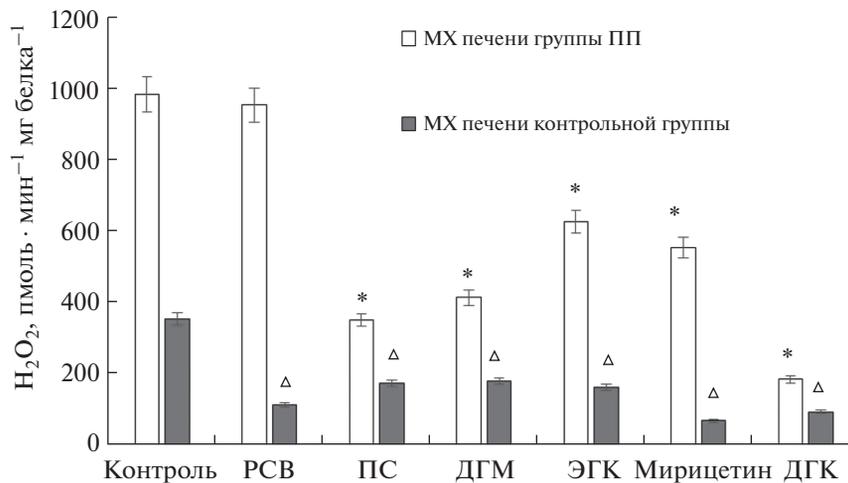


Рис. 3. Влияние полифенолов на скорость генерации АФК (перекиси водорода) *in vitro* митохондриями печени крыс контрольных животных и животных с индуцированной патологией печени в условиях индукции неспецифической мембранной проницаемости. Представлены данные по влиянию полифенолов на продукцию перекиси водорода в митохондриях печени крыс контрольной группы (серые столбики) и данные по влиянию полифенолов на продукцию перекиси водорода в митохондриях печени крыс, с индуцированной гепатотоксичностью (белые столбики). Столбики, подписанные “контроль”, обозначают контроль для каждой группы животных без действия полифенолов. Данные по действию полифенолов сравниваются с “контролем” внутри каждой группы. Представлены скорости образования гидроперекиси митохондриями печени из обеих групп животных, в контроле и после инкубации с полифенолами. Среда инкубации митохондрий, дополнена 100 мкМ Ca^{2+} и 2 мМ P_i . Все полифенолы вносили в концентрации 10 мкМ. Приведены данные 3–5 независимых экспериментов. * – статистически значимые различия между генерацией H_2O_2 митохондриями печени крыс группы ПП без добавления полифенолов (контроль) и данными по действию полифенолов на генерацию H_2O_2 митохондриями печени этой группы. Δ – статистически значимые различия между генерацией H_2O_2 митохондриями печени крыс контрольной группы без добавления полифенолов (контроль) и данными по действию полифенолов на генерацию H_2O_2 митохондриями печени этой группы.

емые эффекты зависят от типа клеточной линии или ткани, продолжительности экспозиции с полифенолами и их концентрации, а также пола и возраста животных [3]. Так, РСВ с одной стороны, способен регулировать активность F_0F_1 -АТРаза/АТР-синтазы, снижая скорость поглощения кислорода митохондриями сердца, мозга и печени [26], а с другой – уменьшать степень перекисного окисления липидов [27] и генерацию супероксидного радикала, а также стимулировать Mn -зависимую супероксиддисмутазу – главный фермент антиоксидантной защиты митохондрий [6]. Дженг и Рамирез [11] констатировали блокирование РСВ АТР-азной активности в митохондриях мозга и печени, предположив, что это связано с взаимодействием соединения с субъединицей F1 ферментного комплекса. Однако точный механизм действия полифенола на митохондриальный синтез АТР и электронный транспорт до сих пор не изучен.

В настоящее время анализ данных о влиянии РСВ на окислительное фосфорилирование митохондрий приводит к парадоксальным заключениям: 1) РСВ подавляет активность системы окислительного фосфорилирования, что приводит к утечке электронов из цепи переноса, однако стимулирует продукцию супероксидного радикала; 2) уменьшение активности комплекса III посред-

ством РСВ также снижает уровень кислородных радикалов, в том числе супероксидного анион-радикала. Следует отметить, что на фоне высказанных предположений измерения генерации АФК в исследованных экспериментальных моделях не проводились. На основании полученных нами данных по влиянию полифенола на скорость генерации перекиси водорода митохондриями печени крыс можно предположить, что при индуцированной патологии печени РСВ может подавлять активность системы окислительного фосфорилирования и тем самым уменьшать уровень АФК, в то время как в контрольных вариантах полифенол такого эффекта не оказывает (рис. 2б). Существует также альтернативное объяснение этих результатов. В работе [6, 28] было описано уменьшение продукции АФК митохондриями печени крыс на фоне увеличения активности митохондриальной Mn -супероксиддисмутазы и уменьшения активности глутатионпероксидазы, что подтвердило прямое действие РСВ на эти ферменты. Антиоксидантный эффект РСВ на митохондрии сердца описан также в работе [27]. При исследовании действия РСВ на функции сердца было показано, что полифенол прямо взаимодействует с АФК и является “гасителем” радикалов [29]. Вероятно, в наших исследованиях может иметь место схожий механизм. Раскрытие

механизма избирательного антиоксидантного действия РСВ на модели токсического гепатита является предметом будущих исследований.

Мы обнаружили, что дигидрофлавонол ДГМ был также способен эффективно подавлять образование перекиси во всех исследованных нами моделях (рис. 2б, рис. 3). В последние годы появилось большое количество работ, посвященных различным аспектам действия ДГМ: регуляции экспрессии генов [30], ренопротекции при химиотерапии цисплатином [31], улучшении поврежденных реакций у животных с нейрпатологией, индуцированной 3-нитропропионатом [32], противовоспалительных эффектах [33], нейропротекции на животной модели болезни Паркинсона [34]. ДГМ, подобно РСВ, может оказывать множественное влияние на митохондриальные функции: проявляет антиоксидантное действие при индуцированном окислительном стрессе в эндотелиальных клетках человека HUVECs [35], запускает селективный митохондриально-зависимый апоптоз в клетках рака легких человека NSCLC при лояльности к нормальным клеткам [36]. Возможно, как и в случае с РСВ, в антиоксидантных эффектах ДГМ имеет место его комплексное воздействие на митохондрии.

ПС (3,5-дигидрокси-*транс*-стильбен) является еще менее изученным представителем класса биологически активных стильбенов. В последние годы в ряде публикаций было показано, что ПС оказывает противовоспалительное и антиканцерогенное действие [37–41]. Антиоксидантная активность ПС в широком диапазоне концентраций (от 0.1 до 200 мкМ) была показана на эпителиальных клетках человека RPE [42]. Авторы подтвердили, что ПС оказывает положительное действие на выживаемость клеток при окислительном стрессе, хотя и не оказывает непосредственного влияния на экспрессию гена Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), выполняющего роль транскрипционного фактора антиоксидантных генов. Однако, данные относительно биологических эффектов ПС хотя и многочисленны, но противоречивы, и не дают представления о механизме действия этого полифенола на молекулярном и клеточном уровне. Данные о влиянии ПС на митохондриальные функции отсутствуют, однако, основываясь на схожести механизмов реализации биологических ответов природных полифенолов в живых системах, а также на структурном сходстве этого полифенола с РСВ (рис. 1), можно предположить, что этот стильбен также может оказывать мощное антиоксидантное действие на митохондрии, особенно ярко выраженное в условиях патологии (рис. 2б, рис. 3).

Интересно отметить, что природный флавоноид мирицетин, проявляющий широкую биологическую активность как противовоспалительный

и антираковый агент, кардиоваскулярный протектор и эффективный антимикотик [43], также показал высокую антиоксидантную активность на митохондриях печени крыс, причем его эффекты были сопоставимы с действием РСВ (рис. 2б). Наряду с этим оказался неожиданным слабывыраженный по сравнению с этими полифенолами эффект хорошо известного своим митохондриально-направленным действием ЭГК [44]. Так, в последних работах было доложено, что этот “полифенол зеленого чая” воздействует на митохондриальный биогенез и биоэнергетику, индуцируя апоптоз в раковых клетках и оказывая антиоксидантное действие в физиологических условиях. Однако, учитывая, что эффекты этого агента строго специфичны в зависимости от концентраций и применяемых клеточных линий [44], можно предположить, что оптимизация модели исследования его действия на митохондриях печени позволит более полно раскрыть потенциал этого митохондриально-направленного соединения.

В целом, стоит подчеркнуть, что все без исключения исследованные нами полифенолы, хотя и в разной степени, оказывали антиоксидантное действие на митохондриях печени животных с токсическим гепатитом, причем как в модели физиологических условий, так и в условиях индукции Ca^{2+} -зависимой РТР. Можно предположить, что в проведенных нами исследованиях имеет место так называемый “комплексный механизм” положительного воздействия полифенолов на печеночную патологию, предложенный в работе [45] и включающий в себя помимо предотвращения окислительного стресса и продукции свободных радикалов индукцию ряда белков, ответственных за биогенез митохондрий (супероксиддисмутаза, каталаза, гем-оксигеназа).

Данные, представленные в настоящей работе, позволяют внести некоторую ясность в противоречивые эффекты полифенолов на митохондриальные функции и демонстрируют, что в условиях клеточной патологии природные полифенолы оказывают мощное антиоксидантное действие, в то время как в физиологических условиях эти соединения могут оказывать либо нейтральный, либо даже мягкий прооксидантный эффект. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых терапевтических стратегий и фармакологических препаратов направленного действия для предотвращения развития и лечения распространенных заболеваний, в основе которых лежит нарушение функционирования митохондрий.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.616.21.0083, уникальный идентификатор проекта RFMEFI1617X0083).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O., Tomás-Barberán F.A. 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* **10** (2), 514–528.
2. Tanase C., Coșarcă S., Muntean D.L. 2019. A Critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules.* **24** (6), 1182. <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>
3. Теплова В.В., Исакова Е.П., Кляйн О.И., Дергачева Д.И., Гесслер Н.Н., Дерябина Ю.И. 2018. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии. *Прикл. биохим. и микробиол.* **54** (3), 215–235.
4. Kim D.H., Kim M.J., Kim D.W., Kim G.Y., Kim J.K., Gebru Y.A., Choi H.S., Kim Y.-H., Kim M.K. 2019. Changes of phytochemical components (urushiols, polyphenols, gallotannins) and antioxidant capacity during *Fomitella fraxinea* – mediated fermentation of *Toxicodendron vernicifluum* bark. *Molecules.* **24** (4), 683. <https://doi.org/10.3390/molecules24040683>
5. Zhang Z., Zheng L., Zhao Z., Shi J., Wang X., Huang J. 2014. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 803–813.
6. Valdecantos M.P., Pérez-Matute P., Quintero P., Martínez J.A. 2010. Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. *Redox Rep.* **15**, 207–216.
7. Murphy M. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417** (1), 1–13.
8. Wang B., Sun J., Ma Y., Wu G., Tian Y., Shi Y., Le G. 2014. Resveratrol preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and attenuates oxidative stress in regulatory T cells of mice fed a high-fat diet. *J. Food Sci.* **79**, H1823–H1831.
9. de Oliveira M.R., Nabavi S.F., Manayi A., Daglia M., Hajheydari Z., Nabavi S.M. 2016. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochim. Biophys. Acta.* **1860** (4), 727–745.
10. Zini R., Morin C., Bertelli A., Bertelli A.A., Tillement J.P. 1998. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* **25** (2–3), 87–97.
11. Zheng J., Ramirez V. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* **130** (5), 1115–1123.
12. Moreira A.C., Silva A.M., Santos M.S., Sardro V.A. 2013. Resveratrol affects differently rat liver and brain-mitochondrial bioenergetics and oxidative stress *in vitro*: Investigation of the role of gender. *Food Chem. Toxicol.* **53**, 18–26.
13. Jamshidzadeh A., Heidari R., Abasvali M., Zarei M., Ommati M.M., Abdoli N., Khodaei F., Yeganeh Y., Jafari F., Zarei A., Latifpour Z., Mardani E., Azarpira N., Asadi B., Najibi A. 2017. Taurine treatment preserves brain and liver mitochondrial function in a rat model of fulminant hepatic failure and hyperammonemia. *Biomed. Pharmacother.* **86**, 514–520.
14. Kobliňová E., Mrázová I., Vernerová Z., Ryska M. 2014. Acute liver failure induced by thioacetamide: Selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol. Res.* **63**, 491–503.
15. Ingawale D.K., Mandlik S.K., Naik S.R. 2014. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **37** (1), 118–33.
16. Федотчева Н.И., Теплова В.В., Белобородова Н.В. 2010. Участие фенольных кислот микробного происхождения в дисфункции митохондрий при сепсисе. *Биол. мембраны.* **27** (1), 60–66.
17. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
18. Тамаркина А.Д., Дементьева Е.С., Крылова Н.И. 1985. Энзимодиагностика механической желтухи. *Вопр. Биомед. химии.* **31** (5), 101–104.
19. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. 2018. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium.* **70**, 56–63.
20. Baines C.P. 2009. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Mol. Cell Cardiol.* **46** (6), 850–857.
21. Boyman L., Coleman A.K., Zhao G., Wescott A.P., Joca H.C., Greiser B.M., Karbowski M., Ward C.W., Lederer W.J. 2019. Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: Transient and permanent opening events. *Arch. Biochem. Biophys.* **666**, 31–39.
22. Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* **84** (2–3), 153–166.
23. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460** (1), 72–81.
24. Бельских Э.С., Звягина В.И., Урясьев О.М. 2016. Современные представления о патогенезе и подходах к коррекции митохондриальной дисфункции. *Наука молодых – Eruditio Juventium.* **1**, 104–112.
25. Cai Z., Zeng W., Tao K., Lu F., Gao G., Yang Q. 2015. Myricitrin alleviates MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction in a DJ-1-dependent manner in SN4741 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458** (2), 227–233.
26. Madrigal-Perez L.A., Ramos-Gomez M. 2016. Resveratrol inhibition of cellular respiration: New paradigm for an old mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **17** (3), 368. <https://doi.org/10.3390/ijms17030368>
27. Gutiérrez-Pérez A., Cortés-Rojo C., Noriega-Cisneros R., Calderón-Cortés E., Manzo-Avalos S., Clemente-Guerrero M., Godínez-Hernández D., Boldogh I., Saavedra-Molina A. 2011. Protective effects of resveratrol on calcium-induced oxidative stress in rat heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43** (2), 101–107.
28. Shin S.M., Cho I.J., Kim S.G. 2009. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. *Mol. Pharmacol.* **76** (4), 884–895.

29. Hung L.M., Su M.J., Chu W.K., Chiao C.W., Chan W.F., Chen J.K. 2002. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br. J. Pharmacol.* **135** (7), 1627–1633.
30. Tang N., Ma J., Wang K.S., Mi C., Lv Y., Piao L.X., Xu G.H., Li X., Lee J.J., Jin X. 2016. Dihydromyricetin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation and target gene expression. *Mol. Cell Biochem.* **422** (1–2), 11–20.
31. Wu F., Li Y., Song H., Zhang Y., Zhang Y., Jiang M., Wang F., Mu Q., Zhang W., Li L., Tang D. 2016. Preventive effect of dihydromyricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **7937385**.
<https://doi.org/10.1155/2016/7937385>
32. Mu S., Li Y., Liu B., Wang W., Chen S., Wu J., OuYang L., Zhu Y., Li K., Zhan M., Liu Z., Jia Y., Ma Y., Lei W. 2016. Dihydromyricetin ameliorates 3NP-induced behavioral deficits and striatal injury in rats. *J. Mol. Neurosci.* **60** (2), 267–275.
33. Wang R., Pi J., Su X., Liu J., Zeng X., Wong I., Huang L., Zhou H., Cai J., Li T., Liu L. 2016. Dihydromyricetin suppresses inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* through inhibition of IKK β activity in macrophages. *Scanning.* **38** (6), 901–912.
34. Ren Z.X., Zhao Y.F., Cao T., Zhen X.C. 2016. Dihydromyricetin protects neurons in an MPTP-induced model of Parkinson's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3 beta activity. *Acta Pharmacol. Sin.* **37** (10), 1315–1324.
35. Hou X., Tong Q., Wang W., Xiong W., Shi C., Fang J. 2015. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sci.* **130**, 38–46.
36. Kao S.J., Lee W.J., Chang J.H., Chow J.M., Chung C.L., Hung W.Y., Chien M.H. 2016. Suppression of reactive oxygen species-mediated ERK and JNK activation sensitizes dihydromyricetin-induced mitochondrial apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Environ. Toxicol.* **32** (4), 1426–1438.
37. Lee S.K., Lee H.J., Min H.Y., Park E.J., Lee K.M., Ahn Y.H., Cho Y.J., Pyee J.H. 2005. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia.* **76** (2), 258–260.
38. Park E.J., Park H.J., Chung H.J., Shin Y., Min H.Y., Hong J.Y., Kang Y.J., Ahn Y.H., Pyee J.H., Lee S.K. 2012. Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases. *J. Nutr. Biochem.* **23** (8), 946–952.
39. Park E.J., Chung H.J., Park H.J., Kim G.D., Ahn Y.H., Lee S.K. 2013. Suppression of Src/ERK and GSK-3/ β -catenin signaling by pinosylvin inhibits the growth of human colorectal cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 424–433.
40. Yang M.H., Kim J., Khan I.A., Walker L.A., Khan S.I. 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sci.* **100** (2), 75–84.
41. Laavola M., Nieminen R., Leppänen T., Eckerman C., Holmbom B., Moilanen E. 2015. Pinosylvin and monomethylpinosylvin, constituents of an extract from the knot of *Pinus sylvestris*, reduce inflammatory gene expression and inflammatory responses *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.* **63** (13), 3445–3453.
42. Koskela A., Reinisalo M., Hyttinen J.M., Kaarniranta K., Karjalainen R.O. 2014. Pinosylvin-mediated protection against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* **20**, 760–769.
43. Devi K.P., Rajavel T., Habtemariam S., Nabavi S.F., Nabavi S.M. 2015. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. *Life Sci.* **142**, 19–25.
44. Shi W., Li L., Ding Y., Yang K., Chen Z., Fan X., Jiang S., Guan Y., Liu Z., Xu D., Wu L. 2018. The critical role of epigallocatechin gallate in regulating mitochondrial metabolism. *Future Med. Chem.* **10**(7), 795–809.
45. Mohib M., Afnan K., Paran T.Z., Khan S., Sarker J., Hasan N., Hasan I., Sagor A.T. Beneficial role of citrus fruit polyphenols against hepatic dysfunctions: A review. 2018. *J. Diet Suppl.* **15**(2), 223–250.

Antioxidant Effect of Natural Polyphenols on Rat Liver Mitochondria with Toxic Hepatitis

D. I. Dergacheva¹, O. I. Klein¹, A. A. Marinichev^{1,2}, N. N. Gessler¹,
V. V. Teplova³, E. P. Isakova¹, Yu. I. Deryabina^{1, *}

¹*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Mendeleev University of Chemistry and Technology, Moscow, 125047 Russia*

³*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: yul_der@mail.ru

Effects of natural polyphenols resveratrol, dihydromyricetin, pinosylvin, epigallocatechin, myricetin, and dihydroquercetin on the peroxide generation in rat liver mitochondria in the conditions of toxic damage induced by hepatotrophic poison thiacetamide were studied. In liver mitochondria of rats with toxic hepatitis all polyphenols at a concentration of 10 μ M served as antioxidants and lowered the signal of the fluorescent probe Amplex Red with the efficiency decreasing in the following order: resveratrol > myricetin > dihydroquercetin > pinosylvin > dihydromyricetin. In liver mitochondria isolated from the control animals the polyphenols studied affected the generation of free radicals insignificantly. In the conditions of the nonspecific

Ca²⁺-dependent permeabilization of mitochondrial membrane in the presence of Ca²⁺ ions and inorganic phosphate, the polyphenols exhibited an antioxidant activity and notably decreased the peroxide generation rate in the mitochondria of the control animals. Mitochondria isolated from the liver of the animals with induced pathology showed more than a 20-fold increase in the peroxide level, which significantly decreased in the presence of polyphenols; most effective among the polyphenols were dihydroquercetin, pinosylvin, and dihydromyricetin, which decreased the level of peroxide production 7–13-fold. The presented data bring the clarity to the ambivalent effect of the polyphenols in living model systems and suggest that under the conditions of cell pathology natural polyphenols should produce a powerful antioxidant effect, while under physiological conditions the polyphenols can exert a neutral or mild pro-oxidant effect. The obtained data may be applied to the development of new potential pharmacological natural preparations to treat common diseases based on mitochondrial pathologies.

Keywords: polyphenols, antioxidants, mitochondria, toxic hepatitis

УДК 612.172.4

NPY-РЕЦЕПТОРЫ УЧАСТВУЮТ В ИЗМЕНЕНИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАБОЧИХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ И ЖЕЛУДОЧКА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

© 2020 г. Н. Г. Искаков^а, А. А. Зверев^{а, *}, Т. А. Аникина^а,
Е. Н. Зверева^а, А. В. Крылова^а, Т. Л. Зефилов^а

^аКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: Aleksei5@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.04.2019 г.

После доработки 15.07.2019 г.

Принята к публикации 16.07.2019 г.

Исследовали влияние нейропептида Y в концентрации 10^{-10} – 10^{-6} М на параметры электрической активности кардиомиоцитов правого предсердия и правого желудочка крыс 7-суточного возраста. Установлено влияние нейропептида Y на длительность фазы реполяризации потенциала действия. Нейропептид Y в концентрации 10^{-8} и 10^{-7} М уменьшал длительность фазы реполяризации у 7-суточных крыс и не изменял мембранный потенциал и длительность фазы деполяризации у новорожденных крысят.

Ключевые слова: нейропептид Y, мембранный потенциал, потенциал действия, кардиомиоциты, крыса

DOI: 10.31857/S0233475520020061

ВВЕДЕНИЕ

Нейропептид Y (NPY) представляет собой пептид из 36 аминокислот, выделенный из головного мозга свиньи, который синтезируется и высвобождается из симпатических нервов и мозгового вещества надпочечников [1–3]. NPY был идентифицирован в тканях многих видов животных [4]. Нейропептид Y является высококонсервативным пептидом: его аминокислотная последовательность не имеет видовой специфичности и на 90% идентична у разных представителей позвоночных животных.

NPY является ко-трансммиттером в симпатическом отделе вегетативной нервной системы. NPY может содержаться в пресинаптических везикулах симпатических терминалей совместно с норадреналином и АТР. Показано, что при одновременном высвобождении с норадреналином (НА) и АТР составляющая вазоконстрикторного эффекта активации симпатических терминалей, обусловленная NPY, развивается с наибольшим латентным периодом. Сначала наблюдается краткосрочный эффект АТР, затем НА и только в конце – эффект пептида. Вследствие невозможности обратного захвата, медленной диффузии и протеолитической деградации, время жизни NPY после высвобождения из везикул гораздо больше, чем для непептидных нейромедиаторов [5, 6].

Мишенью NPY являются мембранные рецепторы, сопряженные с $G\alpha_i$ - и $G\alpha_q$ -белками. Было выявлено 5 рецепторов: у млекопитающих – это Y1, Y2, Y4, Y5, Y6, при этом Y6 нефункционален у крыс и человека. Активация Y2-рецепторов вызывает ингибирование аденилатциклазы (АЦ) и снижение внутриклеточного сАМР, а активация Y1- и Y5-рецепторов увеличивает уровень цитозольного Ca^{2+} посредством активации фосфолипазы С [7]. У крыс действие NPY на периферические органы-мишени реализуются преимущественно через постсинаптические Y1-, Y5-рецепторы, а также Y2-рецепторы, расположенные как на пре-, так и на постсинаптической мембране. Следовательно, Y1-, Y2- и Y5-рецепторы являются тремя основными подтипами рецепторов NPY, которые опосредуют биологические функции нейропептида у человека и крысы. Известно, что экспрессия Y1-, Y2-, Y5-рецепторов меняется в раннем постнатальном онтогенезе. Экспрессия Y1- и Y2-типа увеличивается с 20 дня постнатального онтогенеза, а Y5 тип присутствует в миокарде предсердий и желудочков с момента рождения [8].

NPY участвует в различных физиологических функциях, включая регуляцию настроения, аппетита, сердечно-сосудистого и иммунного гомеостаза, ангиогенеза, ремоделирования сердца, моторики желудочно-кишечного тракта и симпатической передачи [9]. Установлено, что нейро-

пептид Y необходим для формирования зрелого типа ионного тока Ca^{2+} -ток L-типа в кардиомиоцитах мыши в ходе постнатального развития [10]. В сердце наиболее известным источником NPY являются постганглионарные симпатические волокна, большинство из которых происходят из нейронов, расположенных в звездчатом ганглии [8, 11].

NPY играет важную роль и в патофизиологии ряда сердечно-сосудистых заболеваний. У людей и животных повышение уровня NPY в плазме наблюдалось при нескольких стрессовых состояниях, включая физические нагрузки, гипоксию, воздействие холода, повреждение тканей и ишемию [12]. Кроме того, повышение содержания NPY в плазме крови наблюдается при патологических состояниях, сопряженных с повышением тонуса симпатического отдела вегетативной нервной системы, таких как гипертония, гипертрофия левого желудочка и сердечная недостаточность [13, 14]. Известно, что у 7-суточных крысят симпатическая иннервация сердца еще не сформирована [15], поэтому представляется интересным, изучение роли NPY в деятельности сердца в условиях незрелости симпатических регуляторных влияний на сердце. Литературные данные указывают на возможное терапевтическое использование препаратов содержащих NPY в новых методах лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью этой работы было изучение роли нейрорепептида Y в регуляции электрической активности миокарда правого предсердия и желудочка крыс в раннем постнатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 7-суточных белых беспородных лабораторных крысах от родительских животных стока *Wistar* из питомника лабораторных животных "Пушино" ($n = 32$). Данный возраст относится к неонатальному периоду развития, который характеризуется незрелостью морфо-функциональных симпатических влияний на сердце [15]. В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана из расчета 1.2 г/кг массы животного, который вводился внутривенно [16], вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в чашку Петри с оксигенизированным раствором Тироде. Сердца препарировали и изготавливали многоклеточный препарат с ушком правого предсердия, поперечным гребешком и фрагментами верхней и нижней полых вен. В другой серии экспериментов использовали препарат правого желудочка, который состоял только из миокарда правого желу-

дочка. Препарат помещали в камеру, куда подавался термостатируемый раствор ($37 \pm 1^\circ\text{C}$): 129 ммоль/л NaCl, 4 ммоль/л KCl, 1.2 ммоль/л $CaCl_2$, 0.5 ммоль/л $MgSO_4$, 20.9 ммоль/л NaH_2PO_4 , 20 ммоль/л $NaHCO_3$, 5 ммоль/л глюкозы, (95% O_2 и 5% CO_2). Буфер Trizma использовали после оксигенации раствора для поддержания pH в пределах 7.3–7.4 (Sigma-Aldrich, США).

Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения на препарате правого предсердия с сохраненным синусным узлом и спонтанной активностью. А также на препарате правого предсердия при навязанном ритме с частотой 5 Гц и правого желудочка с частотой 3 Гц, длительностью стимуляции 5 мс и амплитудой 5–10 В. Внешнее раздражение осуществляли через платиновые электроды. Приготовленный препарат помещался в экспериментальную камеру объемом 3 мл, куда подавался раствор Тироде (37°C) со скоростью 10 мл/мин. После стабилизации амплитудно-временных параметров потенциала действия (ПД) подавался раствор нейрорепептида Y в течение 20 мин. Сначала подавался раствор в наименьшей концентрации, затем производили отмывку препарата раствором Тироде и ожидали восстановления параметров ПД и подавали большую концентрацию. На одном препарате изучали эффект NPY в трех последовательно возрастающих концентрациях. Все растворы готовились в день эксперимента. Регистрацию электрической активности кардиомиоцитов при действии NPY проводили в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-6} М.

Мембранный потенциал (МП) и потенциал действия регистрировали с использованием стеклянных микроэлектродов (диаметр кончика < 1 мкм, сопротивление 30–80 МОм), которые изготавливались в день эксперимента на горизонтальном пуллере P-1000 (Sutter Instruments). Сигналы усиливали с помощью усилителя, затем анализировали параметры ПД при помощи аналогово-цифрового преобразователя E14-140 (L-Card). Полученные записи электрической активности миокарда анализировали в оригинальной программе Elph 3.0. Обработка включала определение величины МП, амплитуды ПД, длительности фазы деполяризации ПД, длительности фазы реполяризации ПД на уровне 20, 50 и 90% спада ПД (ДПД20, ДПД50, ДПД90). Более детально ознакомиться с методикой вычисления вышеуказанных параметров можно в статье Зверев А.А. и др. [17]. Параметры ПД регистрировали на 7-й и 15-й мин после аппликации NPY. В экспериментах использовали химические реактивы и вещество NPY фирмы Sigma-Aldrich.

Таблица 1. Влияние NPY (10^{-8} , 10^{-7} М) на ПД кардиомиоцитов правого предсердия и желудочков 7-суточных крыс

NPY, М	Время, мин	МП, мВ	Амплитуда ПД, мВ	ДПД20	ДПД50	ДПД90	n
				мс			
Предсердие							
10^{-8}	0	82.8 ± 1.3	89.2 ± 1.5	6.4 ± 0.03	11.4 ± 0.6	43.5 ± 1.43	9
	7	82.1 ± 1.2	89.7 ± 1.6	$4.6 \pm 0.1^*$	$7.7 \pm 0.1^*$	$28.0 \pm 0.6^*$	
	15	83.03 ± 1.3	89.2 ± 1.6	$5.7 \pm 0.1^*$	$10.4 \pm 0.7^*$	$38.7 \pm 2.6^*$	
10^{-7}	0	82.8 ± 1.5	86.4 ± 1.0	6.3 ± 0.2	12.5 ± 0.8	46.5 ± 1.9	9
	7	82.9 ± 1.4	92.0 ± 0.8	$5.7 \pm 0.2^*$	$10.4 \pm 0.5^*$	$42.3 \pm 1.5^*$	
	15	83.0 ± 1.2	87.1 ± 1.4	6.2 ± 0.4	12.1 ± 1.3	$42.5 \pm 1.4^*$	
Желудочек							
10^{-8}	0	81.6 ± 1.9	91.2 ± 2.4	96.4 ± 2.3	159.6 ± 4.4	251.9 ± 6.2	7
	7	82.3 ± 2.1	91.6 ± 3.2	95.3 ± 2.8	150.7 ± 4.1	$215.9 \pm 6.1^*$	
	15	84.2 ± 2.3	95.4 ± 2.9	96.5 ± 2.5	157.3 ± 4.9	246.9 ± 7.2	
10^{-7}	0	81.9 ± 2.3	92.6 ± 3.9	97.4 ± 2.6	158.8 ± 4.1	249.6 ± 7.1	7
	7	82.3 ± 3.1	93.6 ± 4.1	95.5 ± 3.1	$135.9 \pm 5.1^*$	$211.9 \pm 5.4^*$	
	15	84.2 ± 2.3	92.7 ± 6.3	97.1 ± 2.9	149.8 ± 4.8	243.7 ± 7.9	

Все результаты в тексте и на рисунках представлены как среднее \pm ошибка среднего для n экспериментов. Полученные результаты обрабатывали в программе PowerGraph Professional 3.3 (Disoft). Проверку выборки на нормальное распределение проводили во всех сериях экспериментов. Статистическую значимость эффектов различных концентраций нейропептида Y по сравнению с контролем выявляли с помощью парного t -критерия Стьюдента после применения ANOVA. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 7-суточных животных NPY в концентрации 10^{-10} и 10^{-6} М не вызывал достоверных изменений в значении МП и параметров ПД животных при спонтанной активности препарата правого предсердия. Частота спонтанной активности также достоверно не изменяется ($n = 11$).

При навязанном ритме NPY в концентрации 10^{-10} , 10^{-9} и 10^{-6} М не вызывал достоверных изменений значений МП и параметров ПД кардиомиоцитов предсердий и желудочков ($n = 10$).

NPY в концентрации 10^{-8} М в предсердиях не изменял мембранный потенциал (с 82.8 ± 1.3 до 83.03 ± 1.3 мВ), амплитуду и длительность фазы деполяризации ПД, однако значительно укорачивал фазу реполяризации ПД. К 7 мин действия NPY ДПД20 уменьшилась с 6.4 ± 0.03 до 4.6 ± 0.1 мс ($p < 0.05$), ДПД50 – с 11.4 ± 0.6 до 7.7 ± 0.1 мс ($p < 0.05$), ДПД90 с 43.5 ± 1.43 до 28.0 ± 0.6 мс ($p < 0.05$, $n = 9$), т.е. на 28, 33 и 35% соответственно (рис. 1, табл. 1).

Через 15 мин наблюдается тенденция к восстановлению длительности фазы реполяризации, однако полного восстановления данного параметра ПД не наблюдается. ДПД20 к 15 мин аппликации NPY составляет 5.7 ± 0.1 мс ($p < 0.05$), ДПД50 10.4 ± 0.7 мс ($p < 0.05$), ДПД90 38.7 ± 2.6 мс ($p < 0.05$, $n = 9$), т.е. уменьшение составляет на 12, 10 и 11% соответственно относительно исходных значений.

NPY в концентрации 10^{-7} М не изменял мембранный потенциал (с 82.8 ± 1.5 до 83.0 ± 1.2 мВ) и длительность фазы деполяризации. К 7 мин действия наблюдается увеличение амплитуды ПД с 86.4 ± 1.0 до 92.0 ± 0.8 мВ, что составляет 6%. ДПД20 уменьшилась с 6.3 ± 0.2 до 5.7 ± 0.2 мс

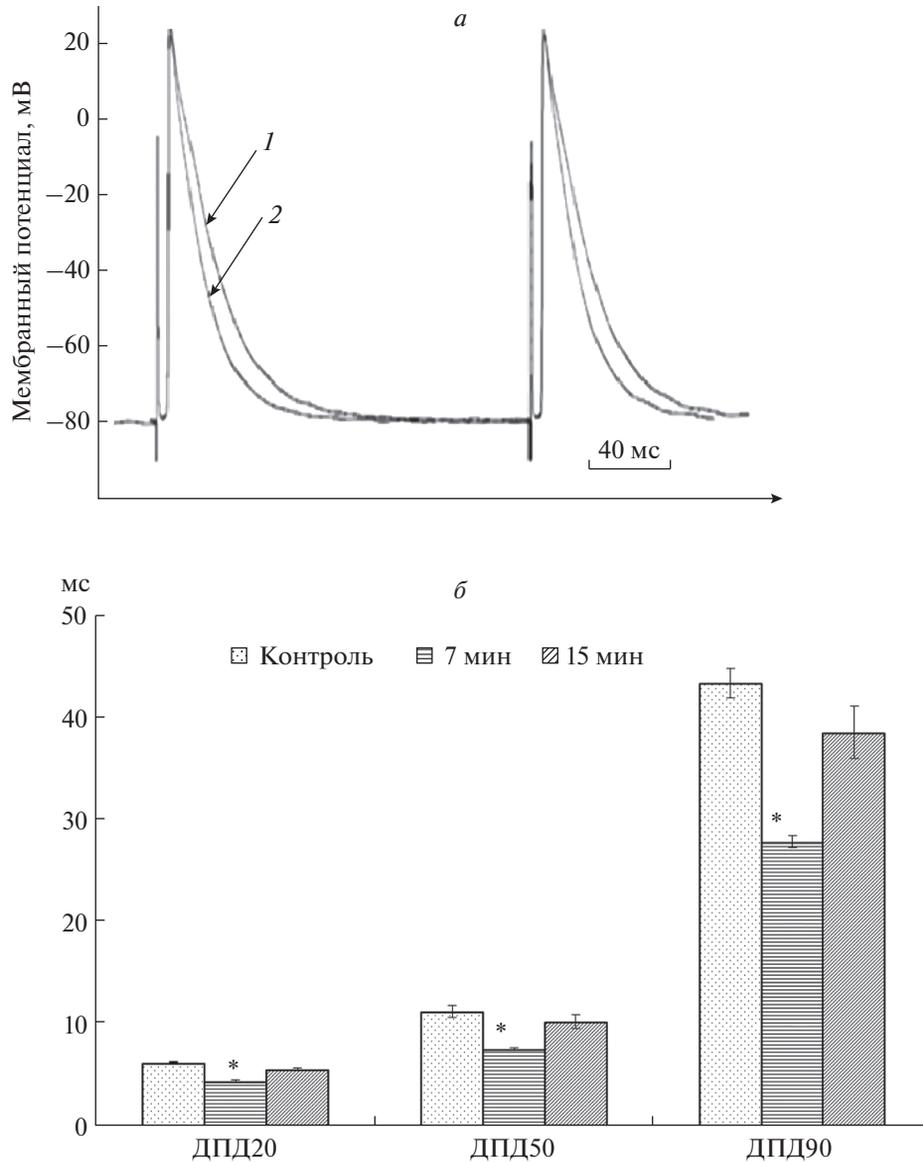


Рис. 1. Влияние НРУ (10^{-8} М) на ПД кардиомиоцитов правого предсердия 7-суточных крыс (навязанный ритм). *а* – Оригинальная запись: 1 – контроль (без воздействия НРУ), 2 – НРУ (7 мин); *б* – изменения длительности фазы реполяризации (* – $p < 0.05$).

($p < 0.05$), ДПД50 с 12.5 ± 0.8 до 10.4 ± 0.5 мс ($p < 0.05$), ДПД90 с 46.5 ± 1.9 до 42.3 ± 1.5 мс ($p < 0.05$, $n = 9$), т.е. на 9, 17 и 9% соответственно. К 15 мин наблюдается восстановление значений ДПД20 и ДПД50 до исходных значений при продолжающемся действии НРУ. В то же время полного восстановления ДПД90 не происходит, и ДПД90 составляет 42.5 ± 1.4 мс ($p < 0.05$, $n = 9$).

Аппликация НРУ на препараты желудочков в концентрации 10^{-8} М не приводила к изменению мембранного потенциала (81.6 ± 1.9 и 84.2 ± 2.3 мВ), амплитуды и длительности фазы деполяризации ПД, незначительно укорачивая фазу реполяризации ПД. К 7 мин действия НРУ ДПД20 умень-

шается с 96.4 ± 2.3 до 95.3 ± 2.8 мс, ДПД50 – с 159.6 ± 4.4 до 150.7 ± 4.1 мс, ДПД90 с 251.9 ± 6.2 до 215.9 ± 6.1 мс ($p < 0.05$, $n = 7$), т.е. на 1, 6 и 14% соответственно (рис. 2, табл. 1).

НРУ в концентрации 10^{-7} М не изменял мембранный потенциал (81.9 ± 2.3 и 82.6 ± 2.6 мВ), амплитуду и длительность фазы деполяризации ПД кардиомиоцитов желудочков, незначительно укорачивая фазу реполяризации ПД. К 7 мин ДПД20 уменьшилась с 97.4 ± 2.6 до 95.5 ± 3.1 мс, ДПД50 с 158.8 ± 4.1 до 135.9 ± 5.1 мс ($p < 0.05$), ДПД90 с 249.6 ± 7.1 до 211.9 ± 5.4 мс ($p < 0.05$), т.е. на 2, 14 и 15% соответственно.

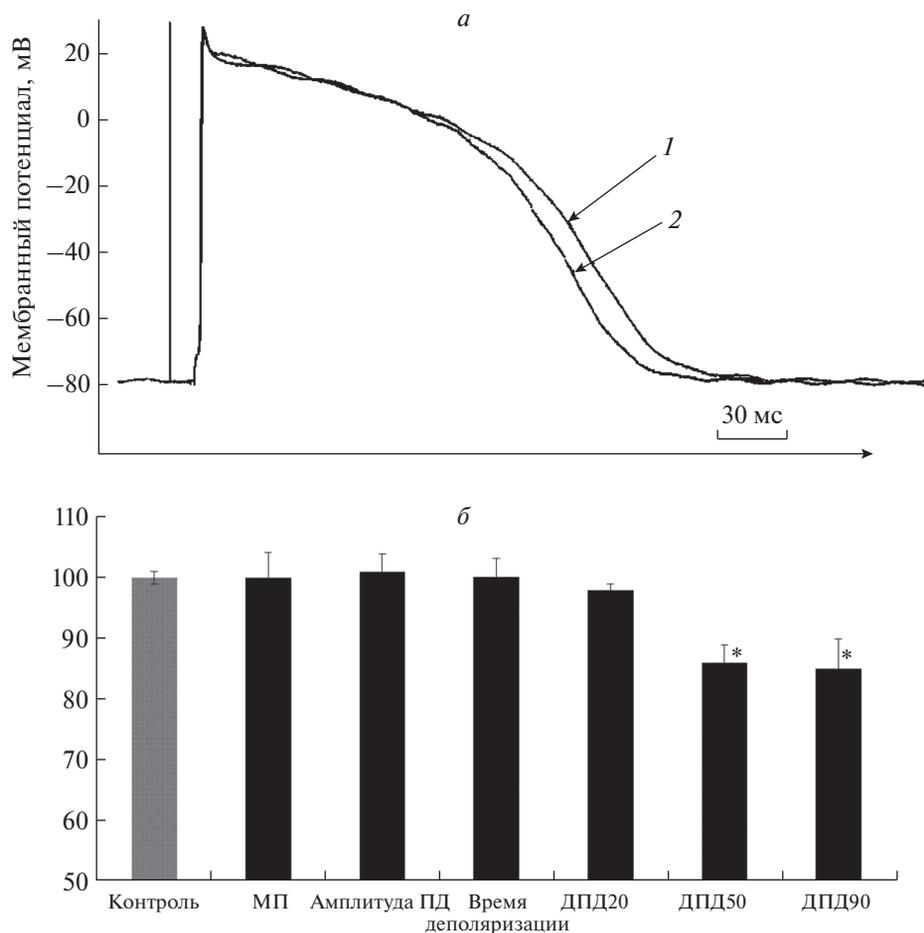


Рис. 2. Влияние NPΥ (10^{-7} М) на ПД кардиомиоцитов правого желудочка 7-суточных крыс (навязанный ритм). *a* – Оригинальная запись: 1 – контроль (без воздействия NPΥ), 2 – NPΥ (7 мин); *б* – значения параметров ПД при действии NPΥ в % от контроля (* – $p < 0.05$).

Уменьшение длительности ПД в ответ на аппликацию NPΥ у 7-суточных животных является кратковременным. К 15 мин наблюдается тенденция к восстановлению длительности фазы реполяризации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что длительность фазы реполяризации потенциала действия в кардиомиоцитах определяется выходящими калиевыми токами: I_{Kur} (сверхбыстрый выходящий ток задержанного выпрямления), $I_{to1,2}$ (транзиторный выходящий ток), I_{Kr} и I_{Ks} (быстрый и медленный компоненты токов задержанного выпрямления), I_{K1} (ток аномального выпрямления) и некоторыми другими. Токи задержанного выпрямления протекают через потенциал чувствительные калиевые каналы. Длительность фазы реполяризации потенциала действия в основном определяется током I_{Kr} [18].

Отсутствие эффекта NPΥ концентрации 10^{-6} М возможно связано с тем, что NPΥ является неселективным агонистом и может активировать разные типы рецепторов, которые сопряжены с разными G-белками: G_i , G_s , G_q . Возможно, происходит нивелирование противоположных эффектов NPΥ.

Активация $Y1$ -рецепторов активирует G_q сигнальный каскад, который высвобождает Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула через инозитолтрифосфат (IP_3). Повышение внутриклеточного Ca^{2+} активирует Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу (CaMK) и протеинкиназу C (PKC), что приводит к усилению K^+ -тока. Активация PKC дополнительно усиливается с помощью диацилглицерина (DAG), образующегося после расщепления фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата (PIP_2) с помощью фосфолипазы C (PLC) [19]. Известно, что нейропептид Y может уменьшать транзиторный выходящий калиевый ток через

ингибирующий G-белок, при активации Y2-рецепторов [10, 19].

Возможной причиной различия эффектов NPY в желудочковом и предсердном миокарде является разное исходное соотношение различных K^+ -токов в предсердиях и желудочках. В желудочковом миокарде преобладает ток I_{to} , а в предсердном — I_{Ks} . Именно эти токи определяют длительность фазы реполяризации [20].

Таким образом, нейропептид Y вызывает изменения паттерна электрической активности миокарда предсердий и желудочков. Полученные нами данные об уменьшении длительности ПД, по всей видимости, связаны с изменениями плотности и кинетики K^+ -каналов, что ведет к увеличению суммарного K^+ -тока. Физиологическая роль NPY в сердце заключается в уменьшении длительности ПД за счет укорочения фазы реполяризации, что приводит к увеличению продолжительности общей паузы. В итоге NPY проявляет кардитропный эффект у новорожденных крысят, несмотря на незрелость симпатической иннервации.

Работа выполнена в рамках реализации программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и при поддержке РФФИ по теме № 18-34-00567 “Влияние нейропептида Y на деятельность сердца крыс в раннем постнатальном онтогенезе”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. 1982. Neuropeptide Y — a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. **296** (5858), 659–660.
2. Pedrazzini T., Pralong F., Grouzmann E. 2003. Neuropeptide Y: The universal soldier. *Cell. Mol. Life Sci.* **60** (2), 350–377.
3. Zukowska Z., Pons J., Lee E.W., Li L. 2003. Neuropeptide Y: A new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81** (2), 89–94.
4. Blomqvist A., Lundell M., Larhammar D. 1990. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y between mammals, chicken, goldfish and horned shark. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **611** (1), 378–378.
5. Morris J.L., Gibbins I.L., Kadowitz P.J., Herzog H., Kreulen D.L., Toda N., Claing A. 1995. Roles of peptides and other substances in co-transmission from vascular autonomic and sensory neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73** (5), 521–532.
6. Burnstock G. 2009. Autonomic neurotransmission: 60 years since Sir Henry Dale. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 1–30.
7. McDermott B.J., Bell D. 2007. NPY and cardiac diseases *Curr. Top. Med. Chem.* **7**(17), 1692–1703.
8. Masliukov P.M., Moiseev K., Emanuilov A.I., Anikina T.A., Zverev A.A., Nozdrachev A.D. 2016. Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats. *Neuropeptides*. **55** (2), 47–54.
9. Michel M.C., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods H.N., Herzog H., Larhammar D., Quirion R., Schwartz T., Westfall T. 1998. XVI. International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50** (1), 143–150.
10. Protas L., Barbuti A., Qu J., Rybin V.O., Palmiter R.D., Steinberg S.F., Robinson R.B. 2003. Neuropeptide Y is an essential *in vivo* developmental regulator of cardiac ICa. *L. Circ. Res.* **93** (10), 972–979.
11. Richardson R.J., Grkovic I., Allen A.M., Anderson C.R. 2006. Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the left ventricle of the rat heart. *Cell Tissue Res.* **324** (1), 9–16.
12. Pernow J., Öhlén A., Hökfelt T., Nilsson O., Lundberg J.M. 1987. Neuropeptide Y: presence in perivascular noradrenergic neurons and vasoconstrictor effects on skeletal muscle blood vessels in experimental animals and man. *Regul. Pept.* **19** (5), 313–324.
13. Zukowska-Grojec Z., Shen G.H., Capraro P.A., Vaz C.A. 1991. Cardiovascular, Neuropeptide Y and adrenergic responses in stress are sexually differentiated. *Physiol. Behav.* **49** (4), 771–777.
14. Dvorakova M.C., Kruzliak P., Rabkin S.W. 2014. Role of neuropeptides in cardiomyopathies. *Peptides*. **61**, 1–6.
15. Sitdikov F.G., Anikina T.A., Zverev A.A., Bilalova G.A., Khamzina E.I. 2008. Purinergic regulation of rat heart function in ontogeny. *Russian Journal of Developmental Biology*. **39** (5), 269–274.
16. Смирнов В.М. 1995. Симпатическая нервная система не участвует в развитии ваготомической тахикардии. *Бюл. экпер. биол. и мед.* **120** (8), 125–128.
17. Zverev A.A., Anikina T.A., Iskakov N.G., Zefirov A.L., Zefirov T.L. 2018. Effect of neuropeptide Y on action potential generation in working cardiomyocytes of the atrium in rat heart. *Bull. of Exp. Biol. and Med.* **165** (5), 610–612.
18. Virág L., Iost N., Opincariu M., Szolnoky J., Szécsi J., Bogáts G., Szenohradszky P., Varró A., Papp J.G. 2001. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **49** (4), 790–797.
19. Tan C.M.J., Green P., Tapoulal N., Lewandowski A.J., Leeson P., Herring N. 2018. The role of neuropeptide Y in cardiovascular health and disease. *Front. Physiol.* **9**, 1–13.
20. Кодиров С.А. Журавлев В.Л., Сафонова Т.А., Мельников К.Н., Вислобоков А.И. 2004. Ионные каналы в кардиомиоцитах млекопитающих. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* **3** (4), 27–41.

NPY Rreceptors Participate in the Change of Electrical Activity of Working Cardiomyocytes of the Right Atrium and Ventricle of Newborn Rats

N. G. Iskakov¹, A. A. Zverev^{1, *}, T. A. Anikina¹, E. N. Zvereva¹, A. V. Krulova¹, T. L. Zefirov¹

¹*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

**e-mail: Alekcei5@rambler.ru*

We studied the effect of neuropeptide Y in concentrations 10^{-10} – 10^{-6} M on the parameters of the electrical activity of cardiomyocytes of the right atrium and the right ventricle of 7-day-old rats. The effect of neuropeptide Y on the duration of the phase of repolarization of the action potential was established. Neuropeptide Y reduced the duration of the repolarization phase in 7-days rats at concentrations 10^{-8} and 10^{-7} M and did not change the membrane potential and the duration of the depolarization phase in newborn rat pups.

Keywords: neuropeptide Y, membrane potential, action potential, cardiomyocytes, rats

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.

© 2020 г. Н. В. Семёнова^а, *, В. Н. Шмаков^а, М. Э. Пак^б,
И. Н. Третьякова^б, Ю. М. Константинов^а, Л. В. Дударева^а

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

^бИнститут леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Академгородок, 660036 Россия

*e-mail: tashasemyonova@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2019 г.

После доработки 12.07.2019 г.

Принята к публикации 08.08.2019 г.

Хроматографическими и масс-спектрометрическими методами выявлены существенные различия состава и содержания нейтральных липидов (НЛ) в тканях эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.). Установлено, что доминирующими липидами двух типов линий являются глицериды. При этом триглицериды (ТГ) и 1,2-диглицериды (1,2-ДГ) заметно активнее (в 1.5–3 раза) накапливались в эмбриогенных клеточных линиях, что, вероятно, связано с необходимостью их вовлечения в процессы дифференциации тканей. Показано, что для эмбриогенных линий характерно высокое относительное содержание свободных жирных кислот (СЖК). При этом содержание эфиров стерина у эмбриогенных линий в 1.5–3 раза меньше, чем у неэмбриогенных. Обнаруженные различия в соотношении стерина и их эфиров объясняются активацией стерина из инертной формы для участия в процессах эмбриогенеза на стадии формирования зародышей.

Ключевые слова: клеточные линии, нейтральные липиды, *Larix sibirica*

DOI: 10.31857/S0233475520020127

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время эффективным способом сохранения редких генотипов растений с уникальными признаками является их клональное размножение путем соматического эмбриогенеза и органогенеза [1, 2]. Однако для большинства видов хвойных биотехнология получения соматических зародышей остается трудновыполнимой задачей. Эти трудности вызваны как видовыми особенностями, так и недостатком сведений об условиях и механизмах индукции соматического эмбриогенеза у голосеменных растений [3]. Состав липидов и жирных кислот как основных структурных компонентов растительных мембран так же изменяется в зависимости от физиологического состояния клеток и тканей [4, 5]. Степень этого варьирования определяется генотипом и зависит от факторов среды [6, 7].

Известно, что нейтральные липиды (НЛ) и жирные кислоты играют важную роль в росте и развитии растений как *in vivo*, так и *in vitro* в качестве энергетического и субстратного резерва [8–10]. НЛ, в частности, триглицериды (ТГ), эфиры стерина (ЭС) и воски, не имеют по определению

заряженных групп и поэтому не могут интегрироваться в бислойные мембраны в значительных количествах. Поэтому ТГ и ЭС обычно выполняют роль депо для хранения стерина, жирных кислот и диглицеридов (ДГ). Наиболее доступными запасными источниками энергии являются глицериды, обеспечивающие обменные процессы в растительных организмах. Так, ТГ представляют собой эффективную форму накопления углерода и энергии у 80% видов растений. Количество ТГ и их жирнокислотный состав играют важную роль в жизнедеятельности растительного организма в целом [9, 11]. В то же время физиологическая роль глицеридов не ограничивается функцией резерва энергии. Запасы этих веществ могут служить источником структурных элементов глицерина, жирных кислот, являющихся исходными продуктами при биосинтезе различных соединений [12, 13]. Еще один тип НЛ – воски, по своей химической природе являются сложными эфирами высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов жирного (реже ароматического) ряда. Это твердые соединения с ярко выраженными гидрофобными свойствами. Природные вос-

ки содержат некоторое количество СЖК и высокомолекулярных спиртов. Они также являются запасными липидами, гидролиз которых высвобождает жирные кислоты и может приводить к образованию длинноцепочечных спиртов [14]. У некоторых растений и у бактерий воски используются в качестве энергетического запаса, кроме того у растений воски обеспечивают гидрофобное покрытие тканей для минимизации обезвоживания поверхностей. Жирные кислоты, находящиеся в составе НЛ, могут быть использованы для производства энергии путем β -окисления или служить субстратами для реакций ацилирования, например, для синтеза фосфолипидов. ДГ служат субстратом для синтеза фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов по пути Кеннеди [15], а также действуют как вторичные мессенджеры трансдукции сигнала при связывании с протеинкиназами [14, 16]. Изучение качественного состава НЛ, в связи с их участием в клеточном росте и развитии *in vitro*, представляет большой интерес, в том числе и потому, что они играют важную роль в процессах развития и последующего прорастания эмбрионов. Например, показано, что дефицит липидов в соматических эмбрионах приводит к нарушению их нормального развития и прорастания [8, 17].

Стерины являются жизненно важными компонентами мембран и играют не только структурную, но и регуляторную роль в клеточных процессах. Они задействованы в упорядочивании жирнокислотных цепей в мембране, что может влиять на ее проницаемость для воды и ионов, а также на активность мембраносвязанных белков [18]. Например, они регулируют активность Na^+/K^+ -АТФ-азы в клеточных мембранах. Показано, что доминирующий в растениях β -ситостерин и другие стерины играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации [19, 20]. Кроме того, стерины могут быть вовлечены в процессы адаптации растительных мембран к изменениям температуры. Таким образом, полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что стерины служат сигнальными и/или регуляторными молекулами, вовлеченными в процессы роста и развития растения [18]. Тем не менее, вплоть до последнего времени отсутствуют какие-либо сведения о количестве и составе НЛ в клеточных линиях с разным эмбрионным потенциалом. Очевидно, что такая информация представляется важной с точки зрения развития подходов и методов клонального размножения хвойных с использованием культуры клеток *in vitro*. В связи с этим целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа содержания НЛ в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии инициации семядолей из семян, собранных у 34 деревьев лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) в возрасте 40–60 лет, произрастающих на территории дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск) и в Хакасии, координаты места сбора – $54^{\circ}38'58''$ северной широты $89^{\circ}26'28''$ восточной долготы (июль 2007–июль 2011 гг.). Семена опытных деревьев очищали от покровных чешуй, поверхностно стерилизовали 5% спиртовым раствором йода в течение 3 мин. После 3-кратной промывки в стерильной дистиллированной воде мегагаметофиты обрабатывали 3% перекисью водорода в течение 5–10 мин. Зародыши извлекали из мегагаметофитов в стерильных условиях, помещали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашках Петри и затем переносили на агаризованную питательную среду АИ [3]. В качестве регуляторов роста использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д, 2 мг/л) и 6-бензиламинопурин (БАП, 1 мг/л). Для образования эмбриональной массы (ЭМ) в базовой среде уменьшали концентрацию цитокинина (до 0.5 мг/л). ЭМ инкубировали в темноте при $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ с циклом субкультивирования 28 дней. Полученные в результате индукции клеточные линии лиственницы отличались между собой по пролиферативной активности, по количеству незрелых соматических зародышей внутри эмбриональной массы, а также по возможности получения регенерантов [2, 3]. Следует отметить что наибольшее число полноценных регенерантов было получено в линии Кл4, у которой 83.3% соматических зародышей формировались без отклонений фенотипа [21]. Для изучения состава и содержания нейтральных липидов каллусов лиственницы сибирской использовали эмбрионные Кл2, Кл6, Кл4, Кл10 (зародыши вызревают, получены регенеранты) долгоживущие клеточные линии, на стадии пролиферации эмбрионально-суспензорной массы и неэмбрионные линии Кл31, Кл23 (не образуют регенеранты). Для экстракции липидов навеску растительного материала (0.5 г) фиксировали в жидком азоте, добавляли 0.001% ионол и растирали до получения гомогенной массы [22]. Затем добавляли 10 мл смеси хлороформ : метанол (2 : 1 v/v) тщательно перемешивали и оставляли на 30 мин до полной диффузии липидов в растворитель. Количественно переносили раствор в делительную воронку через фильтр, трижды промывая ступку и фильтр смесью растворителя. Для лучшего расслаивания добавляли воду. Для анализа суммарных липидов отделяли нижнюю хлороформную фракцию. Хлороформ (ос. ч., стабилизированный 0.005 мас.% амилена) из липид-

ного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RVO-64 (Чехия).

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) из экстракта получали по методу [23]. Для контроля экстрагируемости липидов (в %) использовали нонадекановую кислоту (C19:0), добавляя ее известное количество на этапе гомогенизации. Дополнительную очистку МЭЖК проводили методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) в камере с бензолом в качестве подвижной фазы ($R_f = 0.71-0.73$). Для визуализации зоны МЭЖК край пластинки опрыскивали 10% раствором H_2SO_4 в этаноле и нагревали в сушильном шкафу при $100^\circ C$. Зону МЭЖК удаляли с пластинки шпателем и элюировали с силикагеля хлороформом.

Анализ МЭЖК проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Детектор – квадрупольный масс-спектрометр, способ ионизации – электронный удар, энергия ионизации 70 эВ, для анализа использовали режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX ($30\text{ м} \times 250\text{ мкм} \times 0.50\text{ мкм}$) со стационарной фазой полиэтиленгликоль. Газ-носитель: гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Температура испарителя $250^\circ C$, источника ионов $230^\circ C$, детектора $150^\circ C$, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, $280^\circ C$. Диапазон сканирования 41–450 а.е.м. Объем вводимой пробы – 1 мкл, делитель потока 5 : 1. Разделение смеси МЭЖК выполняли в изотермическом режиме при $200^\circ C$. Для идентификации ЖК использовали библиотеку масс-спектров NIST 08, архив масс-спектров МЭЖК В. Кристи [24]. Относительное содержание ЖК определяли методом внутренней нормализации – в весовых процентах от общего их содержания в исследуемом образце, с учетом коэффициента отклика ЖК. Абсолютное содержание суммарных МЭЖК определяли с использованием внутреннего стандарта – нонадекановая кислота (C19:0).

Нейтральные липиды получали методом колонной хроматографии, путем деления суммарных липидов на нейтральные, глико- и фосфолипиды [25]. Сорбент Silicagel L 100/160 для хроматографии (Чехия). Абсолютное содержание как отдельных фракций липидов, так и суммарных липидов определяли взвешиванием с помощью электронных весов GR-120 (A&N Company Ltd., Япония), образец высушивали до постоянного веса.

Состав нейтральных липидов анализировали методом одномерной тонкослойной хроматографии на высокоэффективных пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) (сорбент силикагель СТХ-

1ВЭ, зернение 8–12 мкм, толщина слоя 80–100 мкм) в системе для НЛ : гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1 v/v/v) [26]. Для визуализации зон отдельных типов липидов хроматограммы опрыскивали 10% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием при 180° до проявления пятен. Идентификацию отдельных фракций НЛ проводили с использованием соответствующих стандартов (“Supelco”, США), значений R_f из литературных источников [25]. Количественное определение НЛ проводили методом денситометрии (сканер Hewlett-Packard, США), при помощи программного обеспечения Scion Image (Scion Corporation, США).

Абсолютное содержание отдельных НЛ ($P_{\text{НЛ}}$) рассчитывали исходя из их общего веса НЛ (мг/г сух. веса) ($P_{\text{НЛ}}$) в образце и процентного содержания каждой группы НЛ ($C_{\text{НЛ}\% \text{отн.}}$) по формуле:

$$P_{\text{НЛ}} = P_{\text{НЛ}} \times C_{\text{НЛ}\% \text{отн.}} / 100.$$

Статистическая обработка. В таблицах представлены среднеарифметические значения трех-четырёх независимых биологических экспериментов и их стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel 2010. Статистическую значимость различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия Манна–Уитни ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа содержания отдельных групп липидов в эмбрионных и неэмбрионных клеточных линиях лиственницы сибирской приведены в табл. 1. Можно видеть, что абсолютное содержание липидов в эмбрионных линиях было достоверно выше, чем в неэмбрионных. Такая же тенденция сохраняется и для абсолютного содержания НЛ для отдельных клеточных линий (17.9–24.6 мг/г сухого веса для эмбрионных линий и 12.7–13.1 мг/г сухого веса для неэмбрионных линий).

Ранее в нашей работе было установлено, что между эмбрионными и неэмбрионными клеточными линиями лиственницы сибирской имеются существенные различия по жирнокислотному составу суммарных липидов, в первую очередь, по содержанию олеиновой кислоты. Показано, что содержание олеиновой кислоты коррелирует с потенциалом эмбрионности клеточных линий [4]. Для выявления преимущественной локализации олеиновой кислоты в разных группах липидов при соматическом эмбриогенезе нами был определен жирнокислотный состав трех таких групп: нейтральных, глико- и фосфолипидов (рис. 1). В результате установлено, что во всех этих группах в отношении содержания олеино-

Таблица 1. Содержание отдельных групп липидов в эмбрионных и неэмбрионных каллусах лиственницы сибирской (мг/г сухого веса клеточной линии)

Липиды	Кл6(э)	Кл2(э)	Кл4(э)	Кл10(э)	Кл23(нэ)	Кл31(нэ)
НЛ	20.0 ± 4.9	24.5 ± 4.8	17.9 ± 3.3	18.0 ± 2.6	12.7 ± 0.6	13.1 ± 0.5
ГЛ	25.7 ± 4.3	19.9 ± 4.4	19.2 ± 4.5	19.2 ± 3.6	17.4 ± 3.9	20.6 ± 0.4
ФЛ	9.5 ± 2.2	5.5 ± 1.9	6.5 ± 1.1	8.3 ± 2.4	5.7 ± 1.6	5.2 ± 0.2
Сумма ОЛ	55.2 ± 4.5	49.9 ± 2.1	43.6 ± 3.3	45.5 ± 4.2	35.8 ± 2.7	38.9 ± 0.6

Примечание. Кл – клеточная линия, НЛ – нейтральные липиды, ГЛ – гликолипиды, ФЛ – фосфолипиды, ОЛ – общие липиды, э – эмбрионные линии, нэ – неэмбрионные линии.

вой кислоты прослеживается та же тенденция, что и в суммарных липидах – значительно более высокое содержание олеиновой кислоты в линиях с высоким эмбрионным потенциалом. При этом среди эмбрионных клеточных линий имеются достоверные различия в содержании олеиновой кислоты в различных группах липидов. Так в Кл6 большее количество олеиновой кислоты содержится в нейтральных липидах, Кл2 – гликолипиды, Кл4 – гликолипиды, Кл10 – фосфолипиды. Возможно, это связано с различиями между клеточными линиями в возрасте культуры (3–6 лет) (табл. 2), жизнеспособности, пролиферативной активности, в количестве соматических зародышей [21].

Среди НЛ клеточных линий с разным эмбрионным потенциалом идентифицированы следующие типы липидов: моноглицериды (МГ), 1,2-ДГ, 1,3-ДГ, ТГ, стерин и их эфиры, СЖК, метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) и воски (табл. 3).

Эмбрионные линии достоверно отличались от неэмбрионных высоким содержанием СЖК, 1,2-ДГ, ТГ. Для неэмбрионных клеточных ли-

ний отмечено большее содержание МГ, эфиров стерина и восков.

Наши эксперименты показали, что для эмбрионных клеточных линий содержание СЖК было выше как минимум в 2 раза по сравнению с неэмбрионными (табл. 3) и, в целом, было довольно высоким. Обычно количество СЖК в высших растениях невелико, они редко аккумулируются в здоровых тканях. Исключение составляют некоторые водные растения. Так, авторами работы [27] показано, что в тканях водных растений относительно содержание СЖК варьировало от 6.8% (*Potamogeton pectinatus*) до 37.9% (*Spirodela polyrhiza*). В работе [11], посвященной СЖК каллусов льна обыкновенного, отмечено высокое содержание СЖК – 146 мкг/мг общих липидов. Для неэмбрионных каллусов эта величина была ниже на 10%. В работе [28] авторами показано, что каллусы плодов яблони (*Malus sylvestris*) содержали 6.5% СЖК, что в пересчете на абсолютный вес составило 32.6 мкг/мг общих липидов. По-видимому, заметные количества СЖК нередко встречаются в липидах клеточных культур растений. СЖК являются промежуточными

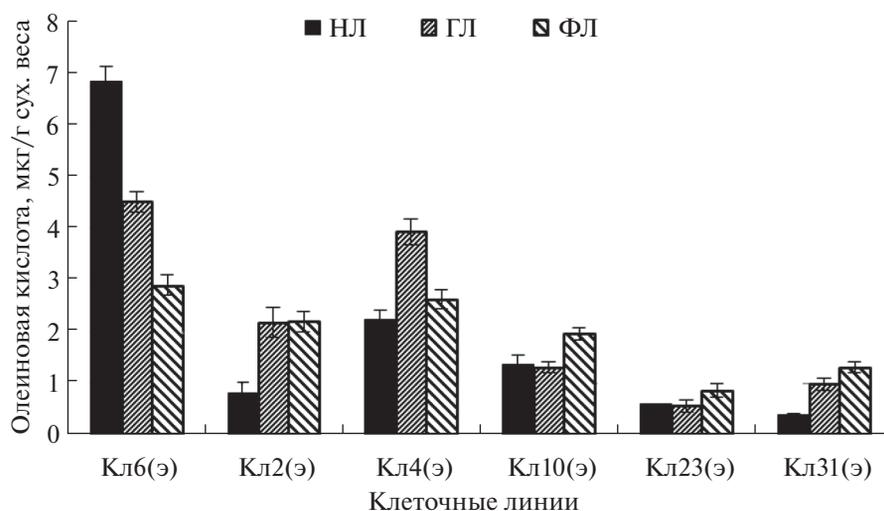


Рис. 1. Содержание олеиновой кислоты в разных липидных группах при соматическом эмбриогенезе. НЛ – нейтральные липиды, ГЛ – гликолипиды, ФЛ – фосфолипиды, э – эмбрионные линии, нэ – неэмбрионные линии.

Таблица 2. Коллекция клеточных линий, полученных в разные годы от дерева генотипа-донора А4 листовницы сибирской [21]

Клеточная линия	Созревание соматических зародышей	Продолжительность культивирования к моменту анализа (2015 г.), лет
Кл2	+	6
Кл6	+	4
Кл4	+	6
Кл10	+	3
Кл23	–	3
Кл31	–	3

веществами в синтезе других метаболитов. Являясь жирорастворимыми анионами, они способны увеличивать протонную проводимость [29]. Возможно, эти или другие функции СЖК могут быть востребованы в процессах морфогенеза в культуре растительной ткани.

Для всех клеточных линий основную долю НЛ составляли глицериды (29.1–33.8% от общих липидов для эмбрионных клеточных линий, 23.9–24.3% (от общих липидов для неэмбрионных клеточных линий), присутствовавшие в форме моно-, ди- и триглицеридов. Известно, что глицериды, в особенности ТГ, в жизнедеятельности растений играют особую роль, поскольку бедны кислородом, но богаты углеродом. Выигрыш энергии при их катаболизме существенно выше по сравнению с распадом углеводов и белков даже с учетом больших размеров этих молекул [30, 31]. При анализе эмбрионных каллусов *Picea glauca* отмечено активное накопление ТГ при культиви-

ровании [32]. Авторы утверждают, что накопление ТГ играет существенную роль для развития каллусной культуры. В процессе культивирования ТГ также обогащаются специфическими жирными кислотами, например, имеются сведения о наличии кислот с углеродной длиной цепи 20–22 атомов, а также о наличии таксолеиновой кислоты Δ5-серии [32], характерной для хвойных и некоторых других эволюционно древних таксонов [33]. В другой работе, посвященной эмбрионным каллусам *Pinus taeda*, также сообщается об увеличении содержания ТГ в процессе поддержания каллусной культуры клеток. Данные по содержанию ТГ в эмбрионных линиях, полученные нами, хорошо согласуются с данными, полученными для каллусов *Pinus taeda* на ранних стадиях культивирования (в пересчете на сухой вес клеточной линии 1.0–3.6 мкг/мг в нашем эксперименте, а у *P. taeda* – 2.5 мкг/мг) [34]. Известно, что ТГ являются запасными липидами, которые легко могут быть вовлечены в катаболизм для получения энергии, необходимой клетке для роста и развития, а также для участия жирных кислот в клеточной сигнализации и синтезе фосфолипидов [7, 14]. Из полученных нами результатов (табл. 3) можно видеть, что для эмбрионных клеточных линий характерно высокое содержание ТГ по сравнению с неэмбрионными. Эта тенденция сохраняется и для 1,2-ДГ (табл. 3). При этом неэмбрионные линии отличались достоверно более высоким содержанием МГ. Такое распределение содержания глицеридов, по-видимому, подтверждает важную роль ТГ и ДГ в процессе эмбриогенеза. Известно, что 1,3-ДГ накапливаются в клетке, выполняя запасающую функцию, в то время как 1,2-ДГ действуют как вторичные мессенджеры в клеточных процессах,

Таблица 3. Состав нейтральных липидов эмбрионных (э) и неэмбрионных (нэ) клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. (мкг/мг общих липидов)

НЛ	Кл2(э)	Кл6(э)	Кл4(э)	Кл10(э)	Кл23(нэ)	Кл31(нэ)
МГ	15.6 ± 1.5	15.5 ± 2.5	14.4 ± 3.1	12.5 ± 2.0	21.8 ± 0.1	20.4 ± 3.3
ДГ-1,2	53.4 ± 2.6	27.8 ± 3.4	35.2 ± 4.4	28.6 ± 3.4	19.8 ± 1.5	18.9 ± 0.5
Стерины	78.5 ± 4.5	58.8 ± 4.0	62.9 ± 2.5	57.0 ± 2.3	58.5 ± 0.9	59.9 ± 10.4
ДГ-1,3	25.0 ± 2.3	22.2 ± 0.8	20.8 ± 3.6	21.3 ± 2.5	16.3 ± 0.5	17.3 ± 4.2
СЖК	116.2 ± 5.1	77.4 ± 11.0	77.5 ± 6.9	79.3 ± 8.5	44.6 ± 1.0	43.7 ± 12.3
ТГ	72.2 ± 1.9	45.1 ± 7.9	56.4 ± 6.4	54.8 ± 6.6	27.0 ± 0.9	25.4 ± 4.3
МЭЖК	30.8 ± 1.9	25.6 ± 3.9	19.3 ± 7.4	19.5 ± 5.1	29.9 ± 1.7	24.6 ± 1.7
Эфиры стерин	30.3 ± 2.9	16.9 ± 0.4	30.9 ± 7.2	28.2 ± 3.8	47.5 ± 1.6	42.7 ± 3.7
Воски	63.8 ± 2.8	55.0 ± 2.6	64.5 ± 16.0	51.5 ± 8.1	82.6 ± 6.2	70.2 ± 5.0
Сумма НЛ	492.0 ± 7.8	362.0 ± 2.1	410.0 ± 9.7	402.5 ± 6.6	335.0 ± 1.7	338.0 ± 4.8

Примечание. НЛ – нейтральные липиды, МГ – моноглицериды, ДГ – диглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты, ТГ – триглицериды, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, э – эмбрионные линии, нэ – неэмбрионные линии. В таблице приведены средние арифметические величины трех–четырёх повторностей и их стандартные отклонения. Статистическую значимость различий сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия Манна–Уитни ($p < 0.05$).

являясь промежуточными звеньями в биосинтезе и катаболизме ТГ, в биосинтезе некоторых фосфолипидов – фосфатидилхолинов, фосфатидилэтанолминов, фосфатидилсеринов. ДГ быстро накапливаются в мембранах, где они связываются с помощью сильных гидрофобных взаимодействий с определенными белками, вызывая тем самым изменения физических свойств бислоя [16, 35]. В работе [12] показано, что для меристем почек лиственницы сибирской содержание 1,2-ДГ было в 2 и более раз выше, чем содержание 1,3-ДГ в теплые месяцы (май, август). Авторы связывают это с тем что, весной идет активное накопление 1,2-ДГ в связи с их последующим участием в синтезе фосфолипидов, в то время как в холодные месяцы (октябрь–февраль) идет накопление 1,3-ДГ для сохранения необходимой клетке энергии. В работе [36], описывающей биосинтез липидов как *in vivo*, так и *in vitro* для семян рыжика посевного (*Camelina sativa*), также показано высокое содержание 1,2-ДГ по сравнению с 1,3-ДГ для каллусов *Camelina sativa* на стадии развития эмбрионов. Более высокое содержание 1,2-ДГ по сравнению с содержанием 1,3-ДГ, вероятно, характерно для эмбрионных клеточных линий из-за их более высокой потребности в этом соединении для активных процессов роста, развития и последующего формирования растений-регенерантов.

В нашей работе содержание восков для клеточных линий с разным эмбрионным потенциалом (способности клеточной культуры образовывать соматические эмбриониды) достоверно не различалось: для неэмбрионных линий – 82.6 ± 6.2 и 70.0 ± 5.0 мкг/мг общих липидов (Кл23 и Кл31 соответственно) и для эмбрионных линий содержание восков составило 51.5 ± 8.1 (Кл10), 64.5 ± 16.0 (Кл4), 63.8 ± 2.8 (Кл2), 55.0 ± 2.6 (Кл6) мкг/мг общих липидов. Содержание эфиров жирных кислот колебалось от 19.3 до 30.8 мкг/мг общих липидов.

Как уже упоминалось, стеринины играют не только структурную, но и регуляторную роль в клеточных процессах. Известно, например, что β -ситостерин и стигмастерин играют ключевую роль в клеточной дифференциации и пролиферации. Известно также, что кампестерин является предшественником brassinosterоинов, которые, в свою очередь, активно участвуют в регуляции роста и развития растений [18].

Известно об активном участии стерининов в формировании мембран и в морфогенетических процессах [18]. Нами установлено, что содержание стерининов в клеточных линиях в пересчете на сухой вес клеточной линии колебалось от 2.1 мг/г сухого веса (Кл23) до 3.9 мг/г сухого веса (Кл2). В наших экспериментах показано, что наряду со свободными стерининами в исследуемых клеточных

линиях обнаружены заметные количества эфиров стерининов (табл. 3). Авторами работы [37] обнаружено, что в каллусной культуре лиственницы японской (*Larix kaempferi*) содержание стерининов составило от 1.0 до 2.5 мг/г сухого веса, что, в целом, согласуется с нашими данными. Для эмбрионных линий льна обыкновенного установлено, что содержание стерининов было 1.45 мг/г сухого веса [38], а для каллусов цикория (*Cichorium intybus*) содержание стерининов составило 0.42 мг/г сухого веса [39], т.е. заметно ниже, чем для клеточных линий лиственницы. Возможно, высокое содержание стерининов в клеточных линиях является видовой особенностью лиственницы сибирской. Из табл. 3 видно, что содержание стерининов не имело существенных различий между линиями с разным эмбрионным потенциалом. При этом содержание эфиров стерининов у эмбрионных клеточных линий было почти в 1.5–2 раза ниже, чем у неэмбрионных. Согласно нашим и литературным данным, эфиры стерининов содержатся в клетках растений в гораздо меньших объемах, чем свободные стеринины [18]. Предполагается, что эфиры стерининов служат инертной формой хранения стерининов [14, 40]. Для количественной оценки конвертации стерининов из связанной формы в свободную нами было рассчитано отношение количества стерининов к количеству эфиров стерининов для эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий (рис. 2). Из представленных результатов видно, что для неэмбрионных линий этот показатель ниже в 1.5–3 раза по сравнению с таковым для эмбрионных клеточных линий.

Из полученных нами данных (табл. 3) видно, что, хотя ТГ и ЭС обычно служат депо для хранения стерининов, жирных кислот и ДГ, для эмбрионных линий содержание ТГ больше, а ЭС меньше, чем для неэмбрионных. Вероятно, для более поздних стадий развития каллусов необходимо высокое содержание ТГ, в частности, для регенерации из каллуса целого растения, как предполагают авторы [34]. Свободные стеринины в процессе созревания соматических зародышей активно участвуют в формировании мембран, и поэтому накопления их эфиров не происходит. Напротив, конвертация свободных стерининов в их эфиры является результатом прекращения деления клеток, и именно тогда избыточные стеринины этерифицируются [41]. Авторами работы [42] показано, что в процессе субкультивирования *Artemisia absinthium* содержание эфиров стерининов снижается с 6.1 до 4.3% от общих липидов, а соотношение стерининов к их эфирам возрастает с 3.0 до 5.4, в то время как содержание ТГ остается практически неизменным. Мы полагаем, что для изучаемой стадии развития эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской характерен большой расход свободных стерининов и, следовательно, высвобождение их из связанной формы.

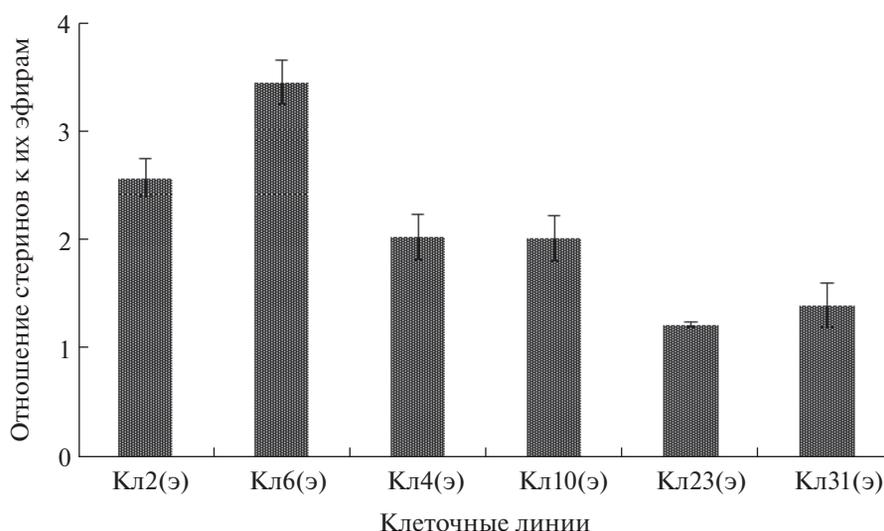


Рис. 2. Отношение стеринов к их эфирам.

В этот же период происходит накопление ТГ, необходимых на более поздних стадиях культивирования.

Анализ полученных результатов показывает, что содержание и качественный состав липидов культуры *in vitro* закономерно различается между клеточными линиями с разным эмбрионным потенциалом. Более высокое содержание ТГ и 1,2-ДГ у эмбрионных клеточных линий по сравнению с неэмбрионными является вполне ожидаемым – ТГ являются запасными липидами, необходимыми в процессах эмбриогенеза для получения энергии, необходимой клетке для роста и развития, а также для участия жирных кислот в составе ТГ в клеточной сигнализации. Действующие как вторичные мессенджеры в клеточных процессах 1,2-ДГ участвуют также в биосинтезе наиболее распространенных форм фосфолипидов, являясь необходимыми для формирования мембран клеток и клеточных оргanelл. Обнаруженные различия в соотношении стеринов и их эфиров указывают на то, что, по-видимому, в эмбрионных клеточных линиях лиственницы стерин активно вовлекаются в процессы эмбриогенеза. В целом, представленные результаты свидетельствуют об активном участии НЛ, в первую очередь ТГ, 1,2-ДГ и стеринов, в процессах эмбриогенеза в тканях лиственницы сибирской *in vitro*. Полученные в настоящей работе результаты имеют также очевидное прикладное значение, поскольку НЛ, участвуя в клеточном росте и развитии *in vitro*, играют важную роль в процессах развития и последующего прорастания эмбрионов. Отметим, что выявленные нами особенности состава нейтральных липидов эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* Ledeb. могут быть использованы в дальнейшем при скрининге клеточ-

ных линий с целью отбора материала для клонального размножения хвойных в культуре *in vitro*.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calney J., Pullman G.S. 2007. Cellular and molecular biology of coniferon biogenesis. *New Phytologist*. **176**, 511–536.
2. Третьякова И.Н., Барсукова А.В. 2012. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы. *Онтогенез*. **43** (6), 1–11.
3. Третьякова И.Н. 2013. Эмбрионные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской. *ДАН*. **450** (1), 122–125.
4. Макаренко С.П., Шмаков В.Н., Дударева Л.В., Столбикова А.В., Семёнова Н.В., Третьякова И.Н., Константинов Ю.М. 2016. Жирнокислотный состав суммарных липидов эмбрионных и неэмбрионных каллусных линий лиственницы. *Физиология растений*. **63** (2), 267–274.
5. Okazaki Y., Saito K. 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J*. **79** (4), 584–596.
6. Лось Д.А. 2001. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот. *Успехи биол. химии*. **41**, 163–198.
7. Ширшова Т.И., Матистов Н.В., Саакян Н.Ж., Петросян М.Т., Попов Ю.Г., Володин В.В. 2012. Содержание нейтральных липидов и жирных кислот в листьях интактных растений и каллусных культурах *Ajuga chia* и *A. genevensis* (Lamiaceae). *Раст. ресурсы*. **3**, 389–395.
8. Feirer R.P., Conkey J.H., Verhagen S.A. 1989. Triglycerides in embryonic conifer calli: A comparison with zygotic embryos. *Plant cell Rep*. **8**, 207–209.

9. Chapman K.D., Dyer J.M., Mullen R.T. 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *J. Lipid Res.* **53** (2), 215–226.
10. Jacomini D., Sinzker R.C., Mangolin C.A., Grande P.A., Nocchi S.R., Nakamura C.V., Olivera A.J.B., Correia Goncalves R.A. 2015. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. *Ind. Crops Prod.* **69**, 408–414.
11. Cunha C.A., Fernandes-Ferreira M. 2003. Ontogenic variations in free and esterified fatty acids during somatic embryogenesis of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Sci.* **164**, 863–872.
12. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. 2009. Особенности обмена глицеридов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb. *Хвойные бореальной зоны.* **26** (2), 291–293.
13. Suzuki M., Shinohara Y., Ohsaki Y., Fujimoto T. 2011. Lipid droplets: Size matters. *Microscopy.* **60** (1), S101–S116.
14. Athenstaedt K., Daum G. 2006. The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1355–1369.
15. Gibellini F., Smith T.K. 2010. The Kennedy pathway – *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* **62** (6), 414–428.
16. Almena M., Merida I. 2011. Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36** (1), 593–603.
17. Murphy D.J. 2011. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals. *Protoplasma.* **249** (3), 541–585.
18. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия.* **81** (8), 1050–1068.
19. Diener C.A., Li H., Zhou W., Whoriskey J.W., Nes D.W., Fink G.R. 2000. *Sterol methyltransferase 1* controls the level of cholesterol in plants. *Plant cell.* **12**, 853–870.
20. Carland F.M., Fujioka Sh., Takatsuto S., Yoshida Sh., Nelson T. 2002. The identification of *CVPI* reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell.* **14**, 2045–2058.
21. Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. 2016. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica* *in vitro*. *Сибир. лесной журн.* **1**, 27–38.
22. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226** (1), 497–509.
23. Christie W.W. 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in Lipid Methodology*. Ed. Christie W.W. Dundee: Two Oily Press, p. 69–111.
24. Christie W.W. Архив масс-спектров метиловых эфиров ЖК. <https://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/index.htm>.
25. Kates M. 1986. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. 2nd ed. Amsterdam–NY–Oxford: Elsevier. 464 p.
26. Malins D.C., Mangold H.K. 1960. Analysis of complex lipid mixtures by thin-layer chromatography and complementary methods. *JAOCS.* **37** (11), 576–578.
27. Розенцвет О.А., Саксонов С.В., Козлов В.Г., Конева Н.В. 2000. Эколого-биохимический подход к изучению липидов высших водных растений. *Изв. Самарского научного центра РАН.* **2** (2), 358–366.
28. Prabha T.N., Raina P.L., Patwardhan M.V. 1988. Lipid profile of cultured cells of apple (*Malus sylvestris*) and apple tissue. *J. Biosciences.* **13** (1), 33–38.
29. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Yu.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vyssokikh M.Yu., Pustovidko A.V., Markova O.V., Yaguzhinsky L.S., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P. 2010. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria targeted protonophore. *PNAS.* **107** (2), 663–668.
30. Алаудинова Е.В., Поваляева В.А., Миронов П.В. 2010. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород центральной сибирии в условиях низкотемпературной адаптации. 3. Особенности обмена нейтральных липидов меристем почек *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. *Химия растит. сырья.* **1**, 67–74.
31. Grigova M., Kubes M., Drazna N., Rezanka T., Lupavska H. 2007. Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): Histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiology.* **27**, 1533–1540.
32. Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta.* **187**, 395–404.
33. Wolff R.L., Comps B., Deluc L.G., Marpeau A.M. 1998. Fatty acids of the seeds from pine species of the *Ponderosa-Banksiana* and *Halepensis* sections. The peculiar taxonomic position of *Pinus pinaster*. *JAOCS.* **75** (1), 45–50.
34. Brownfield D.L., Todd C.D., Stone S.L., Deyholos M.K., Gifford D.J. 2007. Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **88** (2), 217–223.
35. Gomez-Fernandez J.C., Corbalan-Garcia S. 2007. Diacylglycerols, multivalent membrane modulators. *Chem. Phys. Lipids.* **148**, 1–25.
36. Pollard M., Martin T.M., Shachar-Hill Ya. 2015. Lipid analysis of developing *Camelina sativa* seeds and cultured embryos. *Phytochemistry.* **118**, 23–32.
37. Sato M., Saito N., Seki K., Nishikoori M., Tokuji Yo., Ohnishi M. 2007. Effect of exogenous mevalonic acid on sterol lipid classes in *Larix kaempferi* callus. *J. Oleo Sci.* **56** (1), 25–28.
38. Cunha A., Fernandes Ferreira M. 1997. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax. *Plant Sci.* **124**, 97–105.
39. Meena A., Renu S. 2014. Phytochemical screening of sterols extracted from *Cichorium intybus* *in vivo* and *in vitro*. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **3** (2), 1349–1360.

40. Banas A., Carlsson A.S., Huang B., Lenman M., Banas W., Lee M., Noiriell A., Benveniste P., Schaller H., Bouvier-Nave P., Stymne S. 2005. Cellular sterol ester synthesis in plant is performed by an enzyme (Phospholipid: sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA: sterol acyltransferases. *J. Biol. Chem.* **280** (41), 34626–34634.
41. Bailey R.B., Parks L.W. 1975. Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast. *J. Bacteriol.* **124** (2), 606–612.
42. Radwan S.S., Spenser F., Mangold H.K. 1975. Lipids in plant tissue cultures IV. The characteristic patterns of lipid classes in callus cultures and suspension cultures. *Chem. Phys. Lipids.* **14**, 72–80.

Particularities of Neutral Lipid Composition in Embryogenic and Non-Embryogenic Cell Lines of *Larix sibirica* Ledeb.

N. V. Semenova^{1,*}, V. N. Shmakov¹, M. E. Park², I. N. Tretyakova²,
Yu. M. Konstantinov¹, L. V. Dudareva¹

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

²*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*e-mail: tashasemyonova@mail.ru

It was found that glycerides were dominant for both types of cell lines. It was found that triglycerides (TG) and 1,2-diglycerides (1,2-DG) accumulated 1.5–3 times more actively in embryogenic cell lines, which was probably connected with the necessity of the involvement of TG and 1,2-DG in the processes of tissue differentiation. A high relative content of free fatty acids (FFA) was also characteristic of the embryogenic lines. The found differences in the ratio of sterols to their ethers (the content of sterol esters was 1.5–3 times lower in embryogenic cell lines) can indicate that sterols get activated from their inert form to contribute to the embryogenesis processes at a stage of embryo formation.

Keywords: embryogenic and non-embryogenic cell lines, neutral lipids, *Larix sibirica*

УДК 581.1:581.19

ВЛИЯНИЕ ТЕБУКОНАЗОЛА И ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА “БУНКЕР” НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2020 г. Т. П. Побежимова^а, А. В. Корсукова^{а,*}, О. А. Боровик^а, Н. С. Забанова^{а,б}, Н. В. Дорофеев^а, О. И. Грабельных^{а,б}, В. К. Войников^а

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

^бИркутский государственный университет, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: avkorsukova@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.2019 г.

После доработки 07.07.2019 г.

Принята к публикации 13.08.2019 г.

В работе изучено функционирование митохондрий из побегов незакаленных и закаленных (2°C, 7 сут) этиолированных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская), выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим протравителем “Бункер” (1.5 мкл/г семян), и проростков, выращенных на растворе тебуконазола (1 мМ). Показано, что в контрольных температурных условиях (24°C) тебуконазол снижает скорость окисления малата, ингибируя цитохромный путь (ЦП) дыхания, в то время как препарат “Бункер” неспецифически ингибирует скорость переноса электронов по электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и блокирует как ЦП, так и альтернативный (АП) пути дыхания. При холодовом закаливании тебуконазол вызывает усиление окислительной активности митохондрий, увеличивая потенциальную (максимально возможную) активность АП, главным образом, при окислении малата, а препарат “Бункер” снижает скорость окисления NADH, ингибируя ЦП. Сделано предположение, что влияние промышленного препарата “Бункер” на дыхание растений опосредовано не только входящим в состав тебуконазолом, но и вспомогательными соединениями.

Ключевые слова: дыхание, окислительное фосфорилирование митохондрий, тебуконазол, тебуконазол-содержащий протравитель, озимая пшеница, низкая температура

DOI: 10.31857/S0233475520020103

ВВЕДЕНИЕ

Изменяющиеся условия внешней среды оказывают существенное влияние на клеточный метаболизм растений, при этом клеточное дыхание представляет собой важное звено в механизмах устойчивости к действию экстремальных факторов, в том числе к неблагоприятным низким температурам. Процесс окислительного фосфорилирования, локализованный в митохондриях, является конечным этапом клеточного дыхания, от эффективности функционирования которого зависит адаптация растений к низкой температуре. Переход растений в состояние покоя и формирование устойчивости к неблагоприятным низким температурам сопровождается ингибированием процессов дыхания [1, 2]. Митохондрии участвуют в механизмах адаптации растений, при этом в развитие холодо- и морозоустойчивости вовлечены митохондриальные энергорассеивающие системы, в том числе цианидрезистентная аль-

тернативная оксидаза (АО) [3, 4]. Активация АО происходит не только при действии низких температур на растения, но и в ответ на действие других неблагоприятных факторов абиотической и биотической природы [5, 6]. Возможная функциональная роль АО при низкой температуре состоит в регуляции образования активных форм кислорода (АФК), термогенезе, поддержании дыхания в условиях ограничения активности цитохромоксидазы, регуляции соотношения NAD(P)H/NAD(P)⁺ и др. [5–9].

Известно, что фунгициды, в том числе триазольной природы, являются ингибиторами митохондриального дыхания, и их действие направлено на комплекс I ЭТЦ митохондрий [10]. Ранее нами было показано, что применяемые в сельском хозяйстве протравители семян триазольной природы вызывают у растений эффект, сходный с холодовым закаливанием. Так, обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем “Бункер”

сопровождалась снижением ростовых процессов [11], увеличением содержания сахаров [12], синтезом дегидринов [11], повышением ненасыщенности жирных кислот [13, 14] у проростков злаков. Эти физиологические и биохимические изменения приводили к повышению холодо- и морозоустойчивости злаков [11–14]. Можно предположить, что в механизмах повышения устойчивости растений к низкой температуре под действием тебуконазол-содержащего протравителя, участвуют митохондрии, а тебуконазол, входя в состав протравителя, влияет на их функциональную активность и активность альтернативной оксидазы.

В связи с этим цель работы – исследовать влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего протравителя на функционирование митохондрий озимой пшеницы в контрольных условиях и при холодовом закаливании и определить возможные изменения потенциальной (максимально возможной) активности альтернативной оксидазы в этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка растительного материала. В экспериментах использовали побеги 3-суточных этиолированных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская), выращенных при 24°C из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом “Бункер” (содержание тебуконазола в препарате 60 г/л), или выращенных на растворе тебуконазола (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол), и проростки этих вариантов после закаливания при 2°C в течение 7 сут. Подготовку растительного материала проводили следующим образом: семена промывали мыльным раствором, замачивали на 20–25 мин в 0.1% растворе перманганата калия и затем тщательно отмывали и просушивали. Обработку семян водным раствором препарата “Бункер” в дозе 1.5 мкл препарата на грамм семян проводили непосредственно перед их проращиванием. Необработанные и обработанные протравителем семена проращивали в течение 3 сут на влажной фильтровальной бумаге на воде в темноте при 24°C в инкубаторе MIR-154 “Sanyo” (Япония). На вторые сутки роста воду из одной части кювет с проростками из необработанных протравителем семян заменяли 1 мМ раствором тебуконазола и продолжали выращивать проростки еще в течение суток (до трехсуточного возраста) в темноте при 24°C. Затем раствор сливали, проростки промывали водой и использовали в эксперименте или подвергали закаливанию. Холодовое закаливание трехсуточных этиолиро-

ванных проростков трех вариантов (проростки из необработанных протравителем семян, проростки из семян, обработанных препаратом “Бункер”, и проростки, выращенные на растворе тебуконазола) проводили при 2°C в течение 7 сут в камере тепла/холода МКТ-240 “Binder” (Германия) в темноте в кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Всего было исследовано 6 вариантов проростков: Контроль – контрольные проростки (24°C, 3 сут); Тебуконазол – проростки, обработанные 1 мМ тебуконазолом (24°C, 3 сут); Препарат “Бункер” – проростки из семян, обработанных 1.5 мкл/г “Бункером” (24°C, 3 сут); Холодовое закаливание – закаленные при +2°C (7 сут) проростки варианта Контроль; Тебуконазол + Холодовое закаливание – закаленные при +2°C (7 сут) проростки варианта Тебуконазол; Препарат “Бункер” + Холодовое закаливание – закаленные при +2°C (7 сут) проростки варианта Препарат “Бункер”.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из побегов озимой пшеницы всех вариантов проростков с помощью дифференциального центрифугирования по методике, опубликованной ранее [15], используя среду гомогенизации, содержащую 300 мМ сахарозы, 40 мМ MOPS-KOH (pH 7.36), 10 мМ KCl, 2 мМ EDTA, 1 мМ MgCl₂, 0.5% цистеина, 0.1% бычьего сывороточного альбумина – BSA. Гомогенат центрифугировали при 4°C в течение 4 мин при 5000 г, полученный супернатант центрифугировали 3 мин при 15000 г для осаждения митохондрий. Осажденные митохондрии промывали средой выделения без цистеина, повторно осаждали при 15000 г в течение 3 мин ресуспендировали в среде того же состава до концентрации белка 10–12 мг/мл и хранили на льду.

Полярографический анализ. Скорость дыхания митохондрий определяли кислородным электродом Кларка, используя полярограф Oxytherm system “Hansatech Inst.” (Англия) в ячейке объемом 1.4 мл. Реакционная среда содержала 300 мМ сахарозы, 18 мМ KH₂PO₄ (pH 7.36), 1 мМ MgCl₂, 5 мМ EDTA. Анализ активности митохондрий проводили с субстратами, при окислении которых в транспорте электронов участвовали отдельные, заранее известные комплексы ЭТЦ. Были использованы следующие субстраты: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат (транспорт электронов начинается с комплекса I ЭТЦ); 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат (транспорт электронов начинается с комплекса II ЭТЦ); 1 мМ NADH (поток электронов проходит по участку ЭТЦ “внешняя” NADH-дегидрогеназа – комплекс III – убихинон – комплекс IV) и 2 мМ аскорбат + 0.2 мМ тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD) – аскорбат в

присутствии TMPD является эффективным искусственным донором электронов, которые через цитохром *c* подаются в комплекс IV, минуя другие комплексы [16]. При использовании в качестве субстратов окисления сукцината и NADH транспорт электронов в комплексе I блокировали добавлением в реакционную среду 3 мкМ ротенона. При окислении NADH из состава среды инкубации исключали EDTA и для активации “внешней” ротенон-нечувствительной NADH-дегидрогеназы включали 0.06 мМ CaCl₂ [17]. Максимальную скорость окисления субстратов измеряли в присутствии 50–200 мкМ ADP.

На основе полярограмм рассчитывали скорость поглощения кислорода в метаболическом состоянии 3 (V_3 , скорость фосфорилирующего дыхания), скорость поглощения кислорода в метаболическом состоянии 4 (V_4 , скорость нефосфорилирующего дыхания), коэффициент дыхательного контроля по Чансу–Вильямсу (КДК = V_3/V_4) и отношение ADP/O [18]. Концентрацию митохондриального белка определяли по методу [19]. Для ингибирования цитохромного пути (ЦП) использовали 0.4 мМ KCN (ингибитор цитохром *c* оксидазы), для ингибирования альтернативного пути (АП) – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту (ВНАМ, ингибитор альтернативной цианидрезистентной оксидазы), которые добавляли в фосфорилирующем состоянии (V_3). Активность ЦП рассчитывали, как дыхание, ингибируемое KCN, а активность АП, связанного с функционированием альтернативной оксидазы (АО), как дыхание, ингибируемое ВНАМ в присутствии KCN (цианидрезистентное дыхание, чувствительное к ВНАМ, или потенциальная (максимально возможная) активность АП). За 100% принимали скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 до добавления ингибиторов (отдельно для каждого субстрата окисления).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в 3-кратной повторности. Данные диаграмм и таблиц представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или в виде медианы (Me) и интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения для доказательства наличия значимых различий между средними значениями применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD Фишера (данные представлены на рисунке в виде $M \pm S.D.$ и в табл. 1 и 2 применительно к активности ЦП и

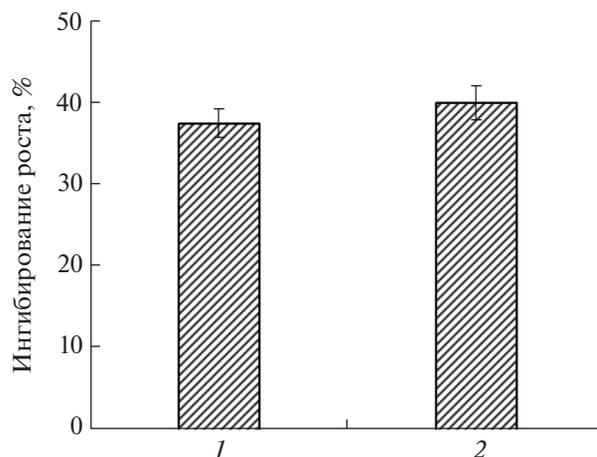


Рис. 1. Влияние тебуконазола (1) и тебуконазол-содержащего препарата “Бункер” (2) на рост колеоптилей озимой пшеницы. $n = 3-4$, $M \pm S.D.$

АП в виде M). Для доказательства наличия значимых различий при распределении отличным от нормального использовали H -критерий Краскела–Уоллиса (данные представлены в табл. 1 и 2 (V_3 , V_4 , КДК, ADP/O) в виде Me [25%; 75%]). Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

В работе были использованы следующие реактивы: ADP (натриевая соль), ATP (натриевая соль), глутамат (натриевая соль), KCN, ротенон (Sigma, Германия); MOPS (AppliChem, Германия); NADH (динатриевая соль), цистеин (ICN Biomedicals, Inc., США); ВНАМ, малат (натриевая соль), тебуконазол (Tebuconazol PESTANAL), TMPD (дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, Германия); BSA (MP Biomedicals Inc., Франция); сукцинат (натриевая соль) (Fluka, Япония); препарат “Бункер” (Август, Россия); EDTA (динатриевая соль) (Amresco, США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч. д. а. и х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе использовали препарат “Бункер” – системный фунгицид (водно-суспензионный концентрат) для протравливания семян профилактического и лечебного действия, а также синтетический тебуконазол (Tebuconazol PESTANAL). Доза препарата “Бункер” (1.5 мкл/г семян) была подобрана в ходе лабораторных исследований по изменению ростовых параметров колеоптилей проростков озимой пшеницы [11]. Концентрация тебуконазола также подбиралась экспериментально: так, тебуконазол в концентрации 1 мМ вызывал ингибирование длины колеоптилей,

Таблица 1. Влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата “Бункер” на скорость окисления различных субстратов в метаболических состояниях 3 (V_3) и 4 (V_4), коэффициент ДК (КДК) и отношение ADP/O и активность цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей в митохондриях из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных при 24°C

Субстрат окисления	V_3	V_4	КДК	ADP/O	Активность пути, %	
	нмоль O_2 /мин/мг белка				ЦП	АП
Контроль						
Малат	56.46 [53.08; 60.03]	18.96 [17.11; 22.00]	3.12 [2.40; 3.41]	2.79 [2.51; 3.01]	69	31
Сукцинат	67.89 [65.50; 71.39]	35.47 [31.59; 38.30]	2.03 [1.71; 2.14]	1.98 [1.73; 2.11]	82	18
NADH	75.0 [73.9; 80.3]	68.21 [62.63; 72.89]	1.13 [1.07; 1.18]	0.77 [0.50; 0.93]	89	11
Аскорбат	90.2 [87.5; 92.6]	70.81 [63.76; 72.05]	1.31 [1.26; 1.39]	0.83 [0.76; 0.95]	100	0
Тебуконазол						
Малат	34.61* [32.15; 37.62]	18.23* [15.26; 19.85]	1.92* [1.73; 2.07]	2.64 [2.48; 2.85]	37*	31
Сукцинат	54.91 [47.31; 65.56]	30.74 [27.66; 34.39]	1.81 [1.67; 1.93]	1.62 [1.46; 1.79]	67*	23*
NADH	73.31 [66.68; 81.90]	52.56 [45.02; 67.91]	1.40 [1.20; 1.51]	0.81 [0.79; 0.87]	78*	12
Аскорбат	85.08 [81.63; 92.40]	67.98 [57.31; 70.14]	1.32 [1.20; 1.49]	0.79 [0.76; 1.21]	100	0
Препарат “Бункер”						
Малат	40.36* [35.40; 42.43]	14.65* [13.93; 15.95]	2.74* [2.16; 2.94]	2.84 [2.68; 3.15]	62	19
Сукцинат	48.76* [43.96; 49.82]	22.16* [17.05; 25.2]	2.20* [1.86; 2.74]	2.01 [1.61; 2.10]	50*	10*
NADH	49.19* [48.06; 53.46]	43.80* [42.00; 46.04]	1.14 [1.12; 1.16]	0.85 [0.47; 0.96]	59*	5*
Аскорбат	50.28* [43.94; 53.28]	40.20* [35.20; 44.28]	1.25 [1.14; 1.32]	1.05 [0.93; 1.18]	57*	0

Примечание. Контроль – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных из необработанных семян при 24°C; Тебуконазол – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных при 24°C в течение 2 сут в отсутствие обработок и 1 сут на растворе 1 мМ тебуконазола; Препарат “Бункер” – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер” (1.5 мкл/г семян) при 24°C.

За 100% при расчете активности АП и ЦП принята скорость поглощения кислорода митохондриями варианта Контроль в состоянии 3 до добавления ингибиторов отдельно для каждого субстрата окисления.

* – указаны обнаруженные статистически значимые различия ($p \leq 0.05$, $n = 4$) с вариантом Контроль при использовании определенного субстрата.

Таблица 2. Влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата “Бункер” на скорость окисления различных субстратов в метаболических состояниях 3 (V_3) и 4 (V_4), коэффициент ДК (КДК), отношение ADP/O и активность цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей в митохондриях из побегов закаленных (+2°C, 7 сут) этиолированных проростков озимой пшеницы

Субстрат окисления	V_3	V_4	КДК	ADP/O	Активность пути, %	
	нмоль O_2 /мин/мг белка				ЦП	АП
Холодовое закаливание						
Малат	35.82 [33.18; 40.21]	12.58 [11.41; 16.11]	2.59 [2.41; 3.10]	2.56 [2.34; 2.60]	64	36
Сукцинат	46.01 [44.17; 48.21]	26.86 [25.00; 29.06]	1.72 [1.61; 1.86]	1.71 [1.20; 2.11]	79	21
NADH	60.16 [49.11; 62.66]	48.78 [42.79; 53.67]	1.15 [1.12; 1.18]	0.94 [0.75; 0.99]	96	4
Аскорбат	57.34 [55.81; 64.97]	43.69 [39.62; 54.00]	1.29 [1.18; 1.45]	0.95 [0.87; 1.23]	100	0
Тебуконазол + Холодовое закаливание						
Малат	41.66 [36.98; 43.68]	14.77 [14.03; 15.53]	2.78 [2.61; 2.96]	2.77 [2.50; 2.94]	67	49*
Сукцинат	49.16 [46.14; 52.87]	28.60 [27.36; 29.53]	1.73 [1.66; 1.80]	1.77 [1.69; 2.09]	81	28*
NADH	63.18 [56.74; 68.88]	53.45 [46.94; 60.70]	1.17 [1.14; 1.21]	1.11 [0.97; 1.27]	108*	9*
Аскорбат	66.59 [56.03; 70.97]	56.45 [41.95; 58.91]	1.25 [1.15; 1.39]	0.96 [0.84; 1.18]	100	0
Препарат “Бункер” + Холодовое закаливание						
Малат	35.22 [30.94; 42.74]	15.68 [13.28; 17.47]	2.69 [1.90; 2.79]	2.53 [2.35; 3.20]	66	35
Сукцинат	41.24 [38.72; 55.05]	24.58 [24.08; 25.13]	1.71 [1.57; 2.20]	1.79 [1.36; 1.90]	75	20
NADH	44.89* [38.84; 50.63]	37.01* [34.58; 44.12]	1.17 [1.09; 1.20]	1.27 [0.91; 1.39]	86*	6
Аскорбат	63.58 [50.74; 69.71]	45.99 [37.36; 54.94]	1.31 [1.21; 1.51]	0.81 [0.62; 1.05]	101	0

Примечание: Холодовое закаливание – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных при 24°C в течение 2 сут и закаленных при 2°C (в течение 7 сут); Тебуконазол + Холодовое закаливание – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных при 24°C в течение 2 сут в отсутствие обработок и 1 сут на растворе 1 мМ тебуконазола и закаленных при 2°C (в течение 7 сут); Препарат “Бункер” + Холодовое закаливание – митохондрии, изолированные из побегов 3-суточных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер” (1.5 мкл/г семян) и закаленных при 2°C (в течение 7 сут).

За 100% при расчете активности АП и ЦП принята скорость поглощения кислорода митохондриями варианта Холодовое закаливание в состоянии 3 до добавления ингибиторов отдельно для каждого субстрата окисления.

* Указаны обнаруженные статистически значимые различия ($p \leq 0.05$, $n = 4$) с вариантом Холодовое закаливание при использовании определенного субстрата.

статистически значимо не отличающееся от ингибирования, которое оказывал препарат “Бункер” в концентрации 1.5 мкл/г семян (рис. 1).

В настоящей работе анализировали последствие тебуконазол-содержащего препарата “Бункер” и тебуконазола на функционирование дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы у проростков, выращенных при 24°C и прошедших холодное закаливание.

Как известно, ЭТЦ растительных митохондрий содержит четыре классических комплекса – комплекс I (NADH-убихинон оксидоредуктаза), комплекс II (сукцинат-убихинон оксидоредуктаза), комплекс III (убихинол-цитохром *c* оксидоредуктаза) и комплекс IV (цитохром *c* оксидаза), а также альтернативные ферменты – ротенон-нечувствительные NAD(P)H-дегидрогеназы (NAD(P)H-ДГ II типа) и цианидрезистентную АО [20]. Используя различные субстраты цикла трикарбоновых кислот и ингибиторы транспорта электронов, можно оценить работу ЭТЦ митохондрий и ее отдельных комплексов.

Свежевыделенные из побегов контрольных проростков митохондрии озимой пшеницы были энергетически активными, с хорошей степенью сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (табл. 1). Об эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях свидетельствует то, что значения отношения ADP/O при окислении митохондриями малата и сукцината были близкими к теоретическим (около 3 для малата, 2 для сукцината). Высокая скорость окисления экзогенного NADH указывает на функционирование в митохондриях озимой пшеницы “внешней” NADH-дегидрогеназы. Поток электронов через комплекс IV ЭТЦ (при окислении аскорбата + TMPD) был сопряжен с фосфорилированием (табл. 1).

Обработка проростков тебуконазолом приводила к существенному ингибированию скорости фосфорилирующего дыхания в изолированных из них митохондриях при окислении малата и незначительному снижению скорости нефосфорилирующего дыхания, в результате этого КДК снижался (табл. 1). Значимого влияния обработки на отношение ADP/O при этом не наблюдали. При использовании в качестве субстратов окисления сукцината, NADH и аскорбата + TMPD статистически значимого снижения скоростей поглощения кислорода и изменений в значениях КДК и ADP/O у митохондрий этого варианта не происходило.

В митохондриях, изолированных из побегов проростков, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом “Бункер”, также наблюдалось значительное снижение

скорости фосфорилирующего дыхания при окислении малата (табл. 1). Однако, в отличие от действия тебуконазола, наряду с ингибированием скорости фосфорилирующего дыхания, происходило значимое снижение и скорости нефосфорилирующего дыхания митохондрий, что не сопровождалось таким сильным снижением КДК, как в митохондриях из обработанных тебуконазолом проростков. При окислении митохондриями других используемых субстратов (сукцината, NADH, аскорбата + TMPD) наблюдали ингибирование скоростей фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания, при этом снижения КДК не наблюдали (табл. 1).

Поскольку тебуконазол и протравитель “Бункер” оказывали влияние на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы, было изучено изменение активности ЦП и АП дыхания в митохондриях после обработки данными препаратами. Анализ проводили с помощью последовательного добавления к митохондриям ингибиторов цитохромного (KCN) и альтернативного (ВНАМ) путей транспорта электронов. Потенциальная активность альтернативного пути в митохондриях, изолированных из контрольных проростков, составляла 31% при окислении малата, 18% при окислении сукцината, 11% при окислении NADH (табл. 1). Более высокая активность АП при окислении митохондриями малата и сукцината ранее наблюдалась и в других работах [4], и было предположено, что это связано с тем, что при окислении малата или сукцината образуется пируват, который, как известно, является активатором АО [21, 22].

Тебуконазол не оказывал влияния на потенциальную активность АП в митохондриях озимой пшеницы, но при этом значительно снижалось цианидчувствительное дыхание при окислении митохондриями малата. Следует отметить, что на фоне сниженного дыхания по цитохромному пути доля АП в дыхании митохондрий возросла более чем в 1.4 раза. В то же время тебуконазол оказывал лишь незначительное влияние на активность ЦП в митохондриях при окислении ими сукцината и NADH, а на потенциальную активность АП не оказывал никакого влияния (табл. 1). При окислении митохондриями аскорбата + TMPD значимых различий в активности ЦП между контрольными проростками и проростками, обработанными 1 мМ тебуконазолом, не обнаружено.

Обработка семян препаратом “Бункер” снижала как активность цитохромного, так и альтернативного путей дыхания независимо от используемого субстрата окисления (табл. 1). Из полученных данных следует, что тебуконазол ингибирует

транспорт электронов через комплекс I ЭТЦ, при этом на фоне ингибирования цитохромного пути доля АП в общем дыхании митохондрий возрастает. В свою очередь, препарат “Бункер” в отличие от тебуконазола ингибирует перенос электронов как по ЦП, так и по АП.

Озимые злаки в природных условиях до перезимовки проходят осеннее закаливание, в результате чего возрастает их холодо- и морозоустойчивость. В связи с этим в следующей части работы представлен анализ действия тебуконазола и тебуконазол-содержащего протравителя на функционирование митохондрий, изолированных из побегов проростков озимой пшеницы, прошедших закаливание.

Холодовое закаливание контрольных проростков озимой пшеницы сопровождалось снижением скоростей как фосфорилирующего, так и нефосфорилирующего дыхания в изолированных из них митохондриях независимо от используемых субстратов окисления (табл. 1, 2). При этом снижение скоростей дыхания (более экономное поглощение кислорода при низкой температуре) не приводило к существенному изменению эффективности окислительного фосфорилирования – наблюдалось только незначительное снижение величин КДК и/или ADP/O при окислении малата и сукцината (табл. 1, 2). Изменения в окислительной активности митохондрий при закаливании проростков были связаны с некоторым повышением потенциальной активности АП при окислении малата и сукцината (табл. 1, 2).

В отличие от контрольных проростков в ответ на холодовую обработку проростков озимой пшеницы, предварительно обработанных тебуконазолом, снижения скорости фосфорилирующего дыхания (V_3) в изолированных из них митохондриях при окислении малата не наблюдали, наоборот, она увеличивалась (табл. 2). В этих условиях на фоне сниженной скорости нефосфорилирующего дыхания происходило увеличение значения КДК (примерно на 45%). При окислении других субстратов повышения степени сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях не детектировали. В сравнении с митохондриями закаленных необработанных проростков для митохондрий из проростков, обработанных перед закаливанием тебуконазолом, было характерно некоторое повышение скоростей дыхания, особенно при окислении малата и аскорбата. При этом увеличение скоростей дыхания митохондрий значимо не отразилось на значениях КДК и ADP/O. По сравнению с необработанными проростками в закаленных проростках, обработанных тебуконазолом, активность АП была больше. При окислении митохондриями

малата и сукцината активность ЦП не изменялась, а при окислении NADH увеличивалась (табл. 2).

Митохондрии, выделенные из закаленных проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом “Бункер” семян, имели более низкие скорости дыхания, чем до закаливания проростков, за исключением дыхания на аскорбате + TMPD (табл. 1, 2). Сопряженность процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях почти не изменялась независимо от субстрата. Следует заметить, что скорость окисления NADH митохондриями из закаленных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер”, была гораздо ниже, чем в митохондриях из закаленных необработанных проростков, в то время как скорости окисления малата, сукцината и аскорбата были сходными (табл. 2). Это можно объяснить ингибированием активности внешней ротенон-нечувствительной NADH-дегидрогеназы компонентами препарата “Бункер” как в контрольных условиях (табл. 1), так и при действии низкой температуры (табл. 2). Других значительных изменений в параметрах окислительного фосфорилирования митохондрий озимой пшеницы, изолированных из закаленных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер”, не было выявлено. Нами также обнаружено, что окислительная активность митохондрий данного варианта опыта была ниже, чем в митохондриях из закаленных проростков озимой пшеницы, предварительно обработанных тебуконазолом (табл. 2). При оценке активности ЦП и АП при закаливании установлено, что, в отличие от действия тебуконазола, обработка препаратом “Бункер” не вызвала изменений в потоке электронов по цитохромному и альтернативному путям, за исключением ингибирования ЦП при окислении NADH (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многие пестициды помимо своего основного целевого воздействия оказывают на растения дополнительные побочные эффекты. Это выражается не только в различной степени фитотоксических проявлений, но и в стимулирующих и рострегулирующих воздействиях. Знание о направленности и силе этих воздействий позволит более грамотно применять химические средства защиты растений, получая дополнительный положительный эффект и позволит избежать отрицательного действия препарата. В настоящей работе исследовано влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего протравителя на функцио-

нирование митохондрий озимой пшеницы в контрольных условиях и при холодном закаливании и определены возможные изменения потенциальной (максимально возможной) активности альтернативной оксидазы в этих условиях.

Показано, что обработка проростков озимой пшеницы тебуконазолом, как и обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом “Бункер”, эффективно ингибировала скорость фосфорилирующего дыхания у митохондрий при окислении ими малата (табл. 1). В связи с этим можно говорить о том, что последствие тебуконазола в митохондриях направлено в большей мере на транспорт электронов через комплекс I ЭТЦ. На это также указывают данные об отсутствии ингибирующего действия тебуконазола на окисление митохондриями сукцината и NADH. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о влиянии системных фунгицидов (витавакса, плантакса и байлетона – производное 1,2,4-триазола) на дыхание корней проростков пшеницы [10]. Как было показано авторами, фунгициды оказывают ингибирующий эффект на дыхание корней, связанный с их влиянием на ЭТЦ митохондрий, при этом не затрагивается гликолиз и цикл Кребса. Действие фунгицидов было аналогично действию ротенона (ингибитору комплекса I ЭТЦ) – как и в случае с ротеноном, ингибирование снималось витамином К₃, что позволило авторам предположить, что фунгициды действуют на комплекс I ЭТЦ митохондрий растений. Анализ полученных нами результатов позволяет полагать, что присутствие тебуконазола как действующего вещества в составе протравителя “Бункер” обуславливает его ингибирующее действие на скорость дыхания митохондрий озимой пшеницы при транспорте электронов через комплекс I ЭТЦ (субстрат окисления малат). В то же время в отличие от действия тебуконазола препарат “Бункер”, ингибируя окисление митохондриями таких субстратов, как сукцинат, NADH и аскорбат, оказывал влияние и на транспорт электронов через комплексы II, III и IV ЭТЦ растительных митохондрий. По-видимому, неспецифическое действие препарата “Бункер” на скорость поглощения кислорода митохондриями связано с влиянием вспомогательных соединений, присутствующих в составе препарата.

В природных условиях озимые злаки до перезимовки проходят осеннее закаливание, что позволяет им переживать неблагоприятные условия зимнего периода [1, 2]. Полученные в настоящей работе результаты показали, что после холодного закаливания проростков озимой пшеницы у изолированных из этих проростков митохондрий

происходило снижение скоростей как фосфорилирующего, так и нефосфорилирующего дыхания независимо от используемых субстратов окисления. Такие изменения в окислительной активности митохондрий после действия низких температур на проростки озимой пшеницы ранее были отмечены другими авторами [23, 24]. Однако митохондрии озимой пшеницы из закаленных при низкой положительной температуре проростков оставались энергетически активными, что является необходимым условием эффективного закаливания и позволяет обеспечивать клетку энергией для синтеза стрессовых белков и других защитных макромолекул. У пшеницы идентифицированы два гена, кодирующих АО, – *AOX1a* и *AOX1c*, содержание транскриптов которых возрастает при закаливании к холоду [25]. Нами ранее было показано, что в начальный период холодного закаливания этиолированных проростков озимой пшеницы одновременно с индукцией экспрессии гена *AOX1c* происходит усиление экспрессии генов *ATP6* и *NAD7*, продукты которых играют ведущую роль при функционировании АТФ-синтазы и комплекса I ЭТЦ, соответственно [4]. Такой скоординированный характер экспрессии данных генов предполагает, что функционирование АО при окислении малата митохондриями в условиях холодного закаливания, по-видимому, позволяет поддерживать $\Delta\psi$ на внутренней митохондриальной мембране за счет пункта сопряжения в комплексе I ЭТЦ, на что указывали в своих работах и другие авторы [26, 27].

Что касается функционирования митохондрий, изолированных из закаленных проростков, обработанных тебуконазолом, то более высокие скорости окисления субстратов и увеличение активности АП дыхания (табл. 2) свидетельствуют о возможной защитной роли тебуконазола в механизмах устойчивости растительной клетки к низкой температуре, связанной с поддержанием синтеза АТФ для обеспечения синтетических процессов в клетке при закаливании. В то же время окислительная активность митохондрий, выделенных из закаленных проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом “Бункер” семян, была ниже, чем до закаливания проростков, и ниже активности митохондрий из закаленных проростков озимой пшеницы, предварительно обработанных тебуконазолом (табл. 2).

Таким образом, тебуконазол и тебуконазол-содержащий препарат “Бункер” оказывают влияние на функционирование митохондрий озимой пшеницы как при обычной температуре выращивания, так и при закаливании, но их действие различно. Тебуконазол и тебуконазол-содержащий

препарат “Бункер” оказывают различное влияние не только на окислительную активность митохондрий, но и на изменение потока электронов по цитохромному и альтернативному путям транспорта. Их действие на скорость окисления субстратов митохондриями зависит от температуры, при которой росли проростки. Учитывая, что препарат “Бункер” и тебуконазол оказывают ростингибирующее действие на проростки озимой пшеницы (рис. 1) и при этом митохондрии, изолированные из таких проростков, выращенных в контрольных условиях, обладают сниженным дыханием, можно полагать, что такое изменение носит адаптивный характер и направлено на снижение расходования субстратов дыхания и повышение холодоустойчивости. При этом транспорт электронов по альтернативному пути через АО под действием тебуконазола не ингибируется, что может быть важным для предотвращения развития окислительного стресса в митохондриях при низкой температуре [3, 28]. При холодом закаливании реализуется другой механизм действия тебуконазола, направленный на поддержание скоростей дыхания митохондрий на более высоком уровне за счет активации АО, функциями которой в период низкотемпературной адаптации может быть поддержание синтеза АТФ для обеспечения синтетических процессов в клетке, а также предотвращение развития окислительного стресса. Так, у митохондрий холодозакаленных проростков, предварительно обработанных тебуконазолом, активность АП была выше, чем у митохондрий из закаленных необработанных проростков и выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер”. Кроме того, при окислении NADH у митохондрий этого варианта проростков цианидчувствительное дыхание увеличилось. Эти изменения значительно увеличили суммарное дыхание (сумму ЦП и АП) в митохондриях из проростков, обработанных тебуконазолом до закаливания, при окислении малата, сукцината и NADH (табл. 2). В отличие от этого у митохондрий, изолированных из закаленных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом “Бункер”, сумма активностей ЦП и АП была равна 100% при окислении малата и сукцината, а при окислении NADH эта сумма была меньше 100%. По-видимому, это связано с тем, что в ответ на закаливание у митохондрий этого варианта скорости окисления снизились до скоростей дыхания митохондрий необработанных закаленных проростков, при этом активность ЦП дыхания была такой же, как у этих проростков (за исключением NADH). Эти результаты свидетельствуют, что процесс холодом закаливания у проростков озимой пшеницы, выращенных из обра-

ботанных препаратом “Бункер” семян, прошел успешно, и, как ранее нами было уже показано, морозоустойчивость таких проростков выше по сравнению с необработанными [11].

На основании полученных данных можно заключить, что тебуконазол, изменяя окислительную активность митохондрий и активность альтернативного пути дыхания, запускает механизм повышения устойчивости растений к низкой температуре. В составе протравителя “Бункер” действие тебуконазола, обусловленное его влиянием на транспорт электронов через комплекс I ЭТЦ, сохраняется, однако к нему добавляется неспецифическое ингибирующее действие на скорость поглощения кислорода митохондриями вспомогательных соединений, присутствующих в препарате, – загустителей, красителей, прилипателя и др. Какие из этих компонентов влияют на транспорт электронов в ЭТЦ митохондрий растений, еще предстоит выяснить.

Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП “Биоресурсный центр” и оборудования ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трунова Т.И. 2007. *Растение и низкотемпературный стресс*. М.: Наука. 54 с.
2. Титов Ф.Ф., Таланова В.В. 2011. *Локальное действие высоких и низких температур на растения*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 166 с.
3. Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Павловская Н.С., Королева Н.А., Боровик О.А., Любушкина И.В., Войников В.К. 2011. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодом закаливании. *Биол. мембраны*. **28** (4), 274–283.
4. Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катышев А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Башмаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. 2014. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и “внешняя” NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы. *Биохимия*. **79** (6), 645–660.
5. Vanlerberghe G.C. 2013. Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6805–6847.
6. Del-Saz N.F., Ribas-Carbo M., McDonald A.E., Lambers H., Fernie A.R., Florez-Sarasa I. 2018. An *in vivo* perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway. *Trends Plant Sci.* **23** (3), 206–219.
7. Finnegan P.M., Soole K.L., Umbach A. 2004. Alternative mitochondrial electron transport proteins in the

- higher plants. In: *Plant mitochondria: from genome to function*. Eds Day D.A., Millar A.H., Whelan J. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 163–230.
8. Грабельных О.И. 2005. Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях. *Журн. стресс-физиол. и биохим.* **1** (1), 37–54.
 9. Lambers H., Robinson A., Ribas-Carbo M. 2005. Regulation of respiration *in vivo*. In: *Plant respiration: from cell to ecosystem*. Eds Lambers H., Ribas-Carbo M. Hamburg: Springer, p. 1–15.
 10. Сафина-Осташевская Г.Ф., Гордон Л.Х. 1984. Действие фунгицидов на дыхательный газообмен корневых пшеницы. *Физиол. растений.* **31** (5), 896–901.
 11. Korsukova A.V., Borovik O.A., Grabelnych O.I., Voinikov V.K. 2015. The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings. *J. Stress Physiol. Biochem.* **11** (4), 118–127.
 12. Корсукова А.В., Грабельных О.И., Боровик О.А., Дорофеев Н.В., Побежимова Т.П., Войников В.К. 2016. Влияние обработки семян тебуконазолом на содержание сахаров и морозоустойчивость проростков озимых пшеницы и ржи. *Агрехимия.* **7**, 52–58.
 13. Korsukova A.V., Gornostai T.G., Grabelnych O.I., Dorofeev N.V., Pobezhimova T.P., Sokolova N.A., Dudareva L.V., Voinikov V.K. 2016. Tebuconazole regulates fatty acid composition of etiolated winter wheat seedlings. *J. Stress Physiol. Biochem.* **12** (2), 72–79.
 14. Корсукова А.В., Горностай Т.Г., Грабельных О.И., Дорофеев Н.В., Побежимова Т.П., Дударева Л.В., Войников В.К. 2018. Жирнокислотный состав проростков озимых и яровых злаков после обработки семян тебуконазол-содержащим препаратом бункера. *Агрехимия.* **11**, 70–76.
 15. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. 2004. *Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез*. М.: ООО “НПК Промэкобезопасность”, 98 с.
 16. Grabelnych O.I., Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. 2001. Complex I of in winter wheat mitochondria respiratory chain is the most sensitive to uncoupling action of plant stress related uncoupling protein CSP 310. *J. Thermal Biol.* **26** (1), 47–53.
 17. Møller I.M., Johnston S.P., Palmer J.M. 1981. A specific role for Ca²⁺ in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria. *Biochem. J.* **194** (2), 487–495.
 18. Estabrook R.W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratio. *Methods in Enzymology.* **10**, 41–47.
 19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265–275.
 20. Møller I.M. 2007. Mitochondrial electron transport and oxidative stress. *Plant Mitochondria. Annual Plant Reviews.* **31**, 185–211.
 21. Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J., Day D.A. 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* **329**, 259–262.
 22. Day D.A., Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. 1994. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. *Plant Physiol.* **106**, 1421–1427.
 23. Нарийчук Ф.Д., Бабенко В.И. 1981. Изменение функциональной активности митохондрий проростков озимой пшеницы в процессе закаливания. *Физиол. и биохим. культ. растений.* **13** (6), 582–586.
 24. Хохлова Л.П., Кучеренкова Н.Н., Абдрахимова Й.Р. 1993. Сезонные изменения митохондрий у закаленных и незакаленных к холоду растений озимой пшеницы. *Физиол. растений.* **40** (4), 607–612.
 25. Mizuno N., Sugie A., Kobayashi F., Takumi S. 2008. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Plant Physiol.* **165**, 462–467.
 26. Pastore D., Trono D., Laus M.N., Di Fonzo N., Passarella S. 2001. Alternative oxidase in durum wheat mitochondria. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role. *Plant Cell Physiology.* **42**, 1373–1382.
 27. Абдрахимова Й.Р., Андреев И.М., Шугаев А.Г. 2011. Участие диссипативных систем в контроле энергетической эффективности дыхания в митохондриях этилированных проростков озимой пшеницы. *Физиол. растений.* **58**, 509–517.
 28. Sugie A., Naydenov N., Mizuno N., Nakamura C., Takumi S. 2006. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic Arabidopsis. *Gen. Genet. Syst.* **81**, 349–354.

The Influence of Tebuconazole and Tebuconazole-Based Disinfectant “Bunker” on the Functioning of Winter Wheat Mitochondria

T. P. Pobezhimova¹, A. V. Korsukova¹, *, O. A. Borovik¹, N. S. Zabanova^{1, 2},
N. V. Dorofeev¹, O. I. Grabelnych^{1, 2}, V. K. Voinikov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

²Irkutsk State University, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: avkorsukova@gmail.com

We studied the functioning of mitochondria from non-hardened and cold-hardened (2°C, 7 days) shoots of etiolated winter wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., variety Irkutskaya) grown from seeds treated with tebuconazole-containing disinfectant “Bunker” (1.5 µL/g of seeds), and seedlings grown on tebuconazole

solution (1 mM). It was shown that in control temperature conditions (24°C) tebuconazole reduced the rate of malate oxidation by inhibiting the cytochrome pathway (CP) of respiration, while the “Bunker” nonspecifically inhibited the rate of electron transfer along the electron transport chain (ETC) and blocked both CP and alternative (AP) paths of respiration. During cold hardening tebuconazole caused an increase in the mitochondrial oxidative activity by increasing the AP activity, mainly during malate oxidation, while the “Bunker” reduced the rate of NADH oxidation by inhibiting CP. We suggest that the effect of the disinfectant “Bunker” on plant respiration is mediated not only by tebuconazole, but also by additional compounds.

Keywords: respiration, oxidative phosphorylation of mitochondria, tebuconazole, tebuconazole-based disinfectant, winter wheat, low temperature

УДК 577.24

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕЙ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ВОЛОСАТИКА *GORDIONUS ALPESTRIS* (NEMATOMORPHA)

© 2020 г. Ч. М. Эльдаров^а, В. Б. Вайс^а, И. М. Вангели^а,
О. А. Аверина^а, Б. Д. Ефейкин^б, Л. Е. Бакеева^а *

^аНИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^бИнститут проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: bakееva@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.04.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 27.07.2019 г.

В работе было проведено морфометрическое исследование внутренней ультраструктуры митохондрий мышечной ткани волосатика *Gordionus alpestris* (Nematomorpha). В качестве основного измеряемого морфометрического параметра был взят общепринятый стереологический параметр – площадь поверхности внутренней мембраны митохондрий на единицу объема митохондрии или поверхностная плотность внутренней мембраны. Был проведен сравнительный анализ значений данного параметра у волосатика с аналогичными данными для митохондрий скелетной и сердечной мышцы. Было установлено, что значение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий волосатика паразитической формы составляет $41.70 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, а свободноживущей формы – $39.42 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, что соответствует значениям этого параметра для кардиомиоцитов мышцы (C57BL/6 × CBA) в возрасте трех месяцев, кардиомиоцитов крыс Wistar в возрасте трех месяцев и достоверно выше, чем у митохондрий скелетной мышцы того же возраста ($33.53 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$). Обсуждается функциональное значение мощно развитой системы митохондриальных мембран протяженных митохондрий волосатика как структуры в качестве структуры, необходимой для обеспечения эффективной работы сократительного аппарата мышечной ткани волосатика.

Ключевые слова: митохондрии, ультраструктура, морфометрия, косоисчерченная мышечная ткань (тип flattened circomyarian)

DOI: 10.31857/S0233475520020048

ВВЕДЕНИЕ

Проведенное нами ранее исследование ультраструктуры хондриома мышечной ткани волосатика (*Gordionus alpestris*) показало, что митохондриальный аппарат лентообразных мышечных волокон, достигающих в длину до 800 мкм, – это мощно развитая митохондриальная система, образованная протяженными митохондриями, расположенными в центральном цитоплазматическом пространстве мышечного волокна и полностью его заполняющими [1]. Однако согласно литературным данным, хондриом мышечной ткани волосатика представлен мелкими, одиночными, редко расположенными митохондриями [2, 3]. Нами было высказано предположение, что система протяженных гигантских митохондрий, обнаруженная в мышечной ткани волосатика, является

не просто морфологической особенностью ультраструктуры данной ткани, но функционально обусловленным типом организации митохондриального аппарата, который выполняет определяющую роль для энергообеспечения активно работающей мышечной ткани.

Известно, что функциональные особенности митохондрий в большой степени определяются не только морфологическими состояниями, но и параметрами внешней и внутренней мембраны митохондрий. Такая оценка состояния хондриома возможна с использованием методов морфометрии и стереологии, позволяющих устанавливать корреляцию митохондриальных структурных параметров с энергетическим режимом митохондрий и ткани в целом [4–9]. Энергетический режим митохондрий хорошо иллюстри-

рует такой общепринятый стереологический параметр, как площадь поверхности внутренней мембраны митохондрий на единицу объема митохондрии или поверхностная плотность внутренней мембраны [10, 11].

Этот параметр был взят нами в качестве основного измеряемого морфометрического параметра для анализа ультраструктуры митохондрий мышечной ткани волосатика. Для обоснования предположения об особенностях структуры митохондрий мышечной ткани волосатика, связанных с уровнем энергозатрат и функциональных нагрузок, мы провели сравнительный анализ данных поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий волосатика с аналогичными данными для митохондрий скелетной и сердечной мышцы мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Особь *Gordionus alpestris* (Villot, 1885) были собраны в Республике Адыгея, пос. Никель (44°10'40.1" N, 40°09'28.2" E), хозяин – двупарноногая многоножка *Pachyiulus krivolutskyi*. Волосатики паразитируют в полости тела различных членистоногих (в основном насекомых). Достигнув определенных размеров, они выходят из хозяев и живут свободно в воде, при этом свободноживущая форма не способна к питанию и умирает вскоре после копуляции. [12]. Исследованы 1 самка, 1 самец паразитарной формы, которых добывали путем вскрытия многоножек, и 2 самки, 2 самца свободноживущей формы. Мышечную ткань забирали на одном и том же уровне центральной части тела особей.

В нашем исследовании были также использованы лабораторные мыши-самцы, F1 (C57Bl/6 × CBA).

Животных содержали в стандартных условиях вивария, в индивидуально вентилируемых клетках (система IVC, TECNIPLAST S.p.A., Италия) по 5 особей, в условиях свободного доступа к корму (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Германия) и воде; в условиях свободных от патогенов; при световом режиме 12/12, в помещениях с кратностью воздухообмена не менее 15 об/ч, с температурой воздуха 20–24°C, влажностью 30–70%; в качестве подстилки использовали деревянную щепу Lignocel (JRS, Германия); все материалы, поступающие к животным, были стерилизованы.

Все манипуляции на лабораторных мышах осуществлялись по протоколу, одобренному локальной комиссией по биоэтике ИЦ ВЭК ООО “НИИ Митоинженерии МГУ”, заключение комиссии номер 67 от 28.04.2015 года.

Для исследования ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы забирали ткань широких мышц бедра: латеральной, меди-

альной и промежуточной (*musculus vastus lateralis, medius, intermedius*).

Для исследования ультраструктуры митохондриального аппарата кардиомиоцитов забирали ткань левого желудочка сердца.

Материал фиксировали 3% раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2 ч при 4°C, затем дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия в буфере в течение 1.5 ч и обезживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта (70% спирт был насыщен уранилацетатом). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме Leica ULTRACUT (Германия), окрашивали свинцом по Рейнольдсу. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEOL JEM-1400 (Япония) с цифровой камерой Emsis QUEMESA. Для морфометрического исследования на каждом отобранном электронно-микроскопическом снимке вручную выделялись отдельные митохондрии, затем внутри каждой митохондрии выделялась внутренняя мембрана. Ширина линии при выделении мембран выбиралась исходя из масштаба снимка, среднюю ширину внутренней мембраны митохондрии на снимке считали равной 75 Å. Учитывая известную толщину среза в 700 Å, с помощью пакета анализа данных в Adobe Photoshop были вычислены различные морфометрические параметры, такие как площадь внутренней мембраны митохондрий в объеме среза, общая длина внутренней мембраны митохондрий и объем митохондрии в срезе. С помощью полученных данных была рассчитана площадь поверхности внутренней мембраны (мкм²) на единицу объема митохондрии (мкм³). Для статистической обработки морфометрических данных использовался пакет STATISTICA 8. Для проверки нормальности данных использовался тест Колмогорова-Смирнова, попарные сравнения делались между формами волосатика, а также между мышцей волосатика и скелетной/сердечной мышцей мыши с поправкой Бонферрони на множественные сравнения и уровнем значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мышечная ткань волосатика (тип flattened circumferential) представлена слоем уплощенных лентообразных мышечных волокон. В центре мышечного волокна располагается узкая цитоплазматическая область, окруженная сплошным периферическим слоем сократительного материала, который образует подобие футляра вокруг центральной цитоплазматической области. На рис. 1а показан участок мышечного волокна на поперечном сечении. Можно видеть узкую цен-

тральную цитоплазматическую область, равномерно заполненную мелкими митохондриями округлой или удлинённой формы. В предыдущем исследовании [1] мы показали, что это поперечные сечения собранных в продольные тяжи протяженных гигантских митохондрий, достигающих в длину более 4 мкм. На рис. 1б при большем увеличении можно видеть, что митохондрии имеют хорошо выраженный матрикс, хаотично расположенные кристы. Различий в структуре митохондриального аппарата самцов и самок выявлено не было. Такая ультраструктурная картина оказалась подходящей для морфометрической оценки поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий мышечных волокон волосатика: отчетливо видны кристы митохондрий и для измерений одновременно доступны сечения 8–10 митохондрий.

В предыдущем исследовании было показано, что ультраструктура митохондрий была идентична у свободноживущих и у паразитарных форм волосатика. В этой работе мы провели измерения на участках поперечного сечения центральной цитоплазматической области мышечных волокон по 20 электронно-микроскопическим фотографиям в обеих группах животных.

На рис. 2 представлены результаты измерения площади поверхности внутренней мембраны в единице объема митохондрии мышечной ткани волосатика. Этот показатель составил $39.42 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ для митохондрий паразитарной формы и $41.7 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ для свободноживущей формы. Значение стандартной ошибки среднего не превышает $1.5 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, статистически достоверных отличий не выявлено, что свидетельствует о том, что митохондрии обеих форм волосатика имеют схожий уровень активности.

Отсутствие разницы в строении митохондрий у свободноживущих и паразитарных форм волосатика (как в предыдущем исследовании, так и в этой работе) можно объяснить тем, что невозможно установить точную фазу жизненного цикла отловленных животных.

Интерес представляет сравнение полученных морфометрических данных о параметрах внутренней митохондриальной мембраны мышечной ткани волосатика с результатами морфометрического анализа митохондрий скелетной и сердечной мышц млекопитающих, характеризующихся энергоёмкими и одновременно синхронными процессами сокращения мышечных клеток.

Хорошо известно, что наряду с существенными различиями в функционировании этих мышечных тканей (в скелетной мышце сокращение и расслабление происходит постоянно, в мышечной ткани сердца – непрерывно) и значительными различиями в структурной организации хондриома сердечной и скелетной мышц,

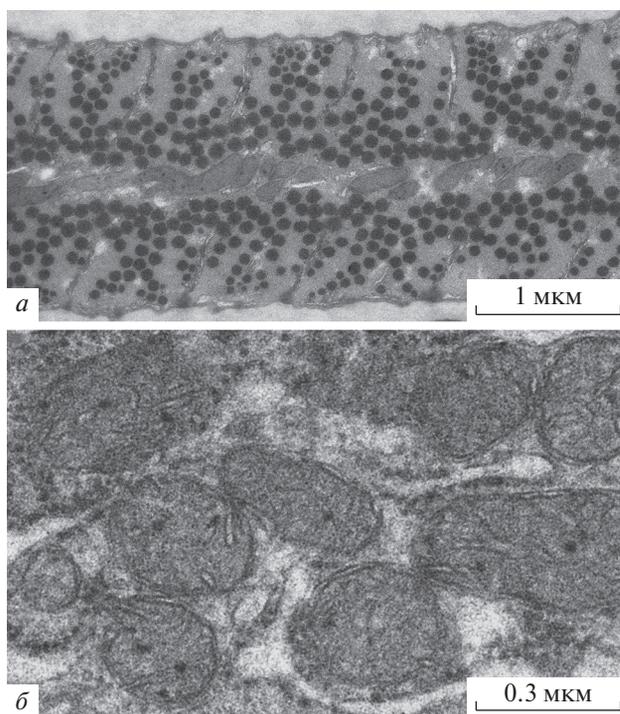


Рис. 1. Ультраструктура митохондрий мышечной ткани волосатика. *а* – на поперечном сечении мышечного волокна можно видеть мелкие одиночные митохондрии, расположенные в центральной цитоплазматической области. *б* – особенности ультраструктуры митохондрий при большем увеличении.

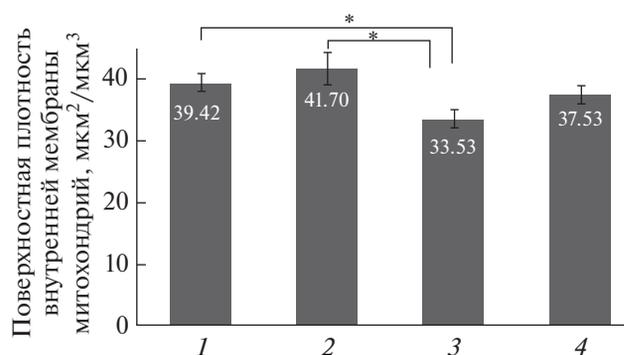


Рис. 2. Поверхностная плотность внутренней мембраны митохондрий в мышечной ткани различных животных: 1 – мышечная ткань паразитической формы волосатика; 2 – мышечная ткань свободноживущей формы волосатика; 3 – скелетная мышца мыши; 4 – сердечная мышца мыши.

ультраструктурная организация хондриома этих мышечных тканей подчинена выполнению одной и той же основной функции – обеспечению эффективной деятельности сократительного аппарата, которое происходит за счет систем мембран гигантских митохондрий, объединенных в единую систему митохондриального ретикулула.

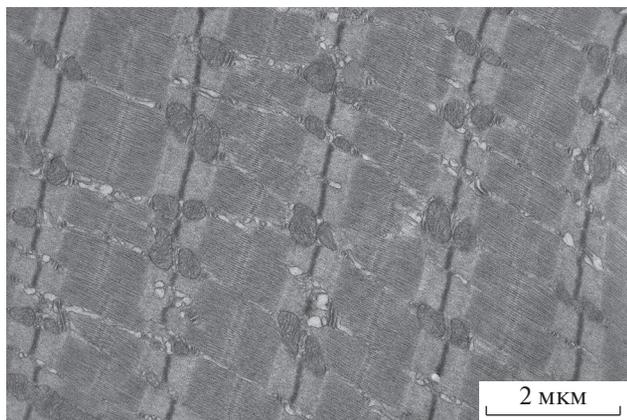


Рис. 3. Участок продольного среза мышечного волокна скелетной мышцы мыши. В изотропной зоне можно видеть поперечные сечения митохондриального ретикулума в виде мелких митохондрий, расположенных попарно по обе стороны Z-линии.

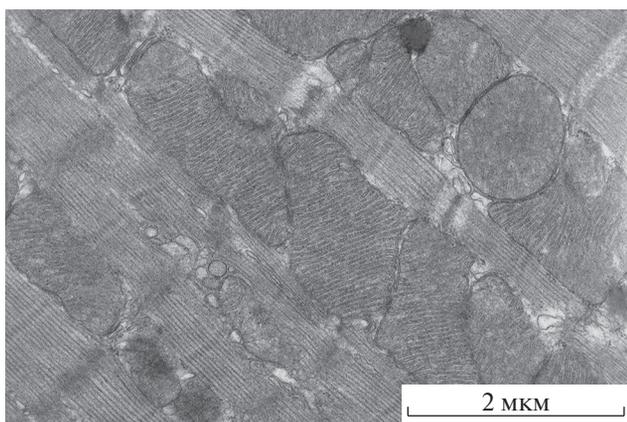


Рис. 4. Участок продольного среза кардиомиоцита мыши. Можно видеть ряды митохондрий, расположенных вдоль миофибрилл.

Как известно, в скелетной мышце основная масса митохондриального материала — митохондриальный ретикулум, образованный разветвленными гигантскими митохондриями — располагается в виде слоев в изотропных зонах, в плоскости перпендикулярной длинной оси мышечного волокна [13, 14]. Поэтому на продольном срезе мышечного волокна мы видим поперечные сечения гигантских митохондрий в виде мелких одиночных митохондрий, расположенных в изотропной зоне попарно по обе стороны от Z-линии (рис. 3).

Морфометрическую оценку поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий скелетной мышцы мыши мы проводили на 20 электронно-микроскопических фотографиях участков продольного среза мышцы, содержащего не менее 15 поперечных сечений митохондриального ретикулума. На рис. 2 можно видеть, что значение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий скелетной мышцы со-

ставляло $33.53 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, что достоверно ниже показателей как для паразитической, так и для свободноживущей формы волосатика.

В кардиомиоцитах митохондриальный материал представлен в виде слоев, образованных митохондриями, объединенными в единую систему митохондриального ретикулума, которые окружают пучки миофибрилл [15, 16]. Такое расположение митохондрий представлено на рис. 4. Анализ поверхностной плотности митохондрий кардиомиоцитов мы проводили также по 20 электронно-микроскопическим фотографиям участков продольных срезов кардиомиоцитов мыши, содержащих не менее 10 сечений митохондрий.

Значение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий кардиомиоцитов мыши составило $37.53 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ (рис. 3). Аналогичные значения были получены нами ранее для митохондрий кардиомиоцитов трехмесячных крыс Wistar, которое составило $41.30 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ [8].

Таким образом, не только морфологические ультраструктурные исследования, но и морфометрический анализ параметров внутренней митохондриальной мембраны показал, что в мышечной ткани волосатика присутствует хорошо развитая митохондриальная мембранная система Косоисчерченная мышечная ткань волосатика (тип flattened circomyarian), имеет черты сходства как с гладкомышечной тканью — митохондрии располагаются в особой зоне — центральном цитоплазматическом пространстве, а не среди миофибрилл, так и с поперечнополосатой — на основании ультраструктуры и особенностей функционирования сократительного аппарата.

Если представить структуру митохондриального аппарата огромных лентообразных мышечных волокон волосатика (согласно литературным данным) [2, 3] в виде мелких, одиночных не связанных друг с другом митохондрий, расположенных в центральном цитоплазматическом пространстве, то очевидно, что при максимальной сократительной работе мелкие, одиночные митохондрии с небольшим количеством крист не смогут обеспечить координированную работу по осуществлению нужной скорости выработки энергии для энергообеспечения протяженных мышечных волокон, достигающих в длину до 800 мкм.

Как показали морфометрические измерения, значения поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий волосатика соответствуют значениям этого параметра для кардиомиоцитов мыши (C57Bl/6 × CBA) в возрасте 3 мес., кардиомиоцитов крыс Wistar в возрасте 3 мес. и достоверно выше, чем у митохондрий скелетной мышцы мыши (C57Bl/6 × CBA) того же возраста.

Согласно существующим представлениям [2, 3], основную часть туловищной мускулатуры волосатика составляют косоисчерченные мышцы.

В косоисчерченных мышечных клетках присутствуют так называемые “косые” саркомеры, т.к. ограничивающие их Z-диски расположены косо по отношению к длинной оси клетки. В отличие от поперечнополосатых мышц в косоисчерченных мышечных клетках Z-диски — это система расположенных в ряд уплотненных фибриллярных участков, разделенных свободными промежутками, где отсутствует жесткая структурная связь толстых миозиновых протофибрилл в центре саркомера. Поэтому при сокращении происходит не только движение актиновых протофибрилл к центрам саркомеров, но и смещение миозиновых протофибрилл относительно друг друга, приводящее к изменению угла наклона саркомера, вследствие чего меняется расположение Z-дисков — они располагаются так же, как и в саркомерах поперечнополосатой мышечной ткани — перпендикулярно длинной оси клетки. Эти структурные особенности косоисчерченных мышечных клеток позволяют генерировать более мощное (по сравнению с поперечнополосатой мышечной тканью) напряжение, необходимое для осуществления разнообразных по направлению сокращений, позволяющих обеспечивать червеобразные движения тела волосатика [17]. Как известно, мышечные сокращения являются зависящими от энергии процессами. Поэтому можно предположить, что обнаруженное нами статистически достоверное увеличение площади поверхности внутренней митохондриальной мембраны в мышечных клетках волосатика по сравнению с митохондриями скелетной мышцы мыши необходимо для обеспечения соответствующего уровня дыхательной активности митохондрий, лежащей в основе особенностей механохимических процессов сокращения мышечных клеток волосатика.

Таким образом, результаты наших исследований организации хондриома мышечной ткани волосатика, на основе ультраструктурного и морфометрического анализов, характеризуют функциональное значение выявленной нами развитой системы митохондриальных мембран протяженных митохондрий, в качестве структуры, необходимой для эффективной работы сократительного аппарата мышечной ткани волосатика.

Авторы выражают глубокую благодарность В.В. Алёшину за помощь при подготовке публикации результатов исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00413).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайс В.Б., Вангели И.М., Эльдаров Ч.М., Ефейкин Б.Д., Бакеева Л.Е. 2019. Митохондрии с характерной для энергоемких процессов клетки структурной организацией в косо-исчерченной мышечной

ткани *Gordionus alpestris* (Nematomorpha, Gordioidea). *Биохимия*. **84** (1), 56–61.

2. Lanzavecchia G., Valvassory R., Magda de Eguileor, Lanzavecchia P. 1979. Three-dimensional reconstruction of the contractile system of the Nematomorpha muscle fiber. *J. Ultrastruct. Res.* **66**, 201–223.
3. Restelli M. A., de Villalobos L.C., Fernanda Z. 2002. Ultrastructural description of the musculature, the intraepidermal nervous system, and their interrelation in *Pseudochordodes bedriagae* (Nematomorpha). *Cell Tissue Res.* **308**, 299–306.
4. Weibel E.R. 1979. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. *Academic Press, London*. **1**.
5. Gundersen H.J., Bendtsen T.F., Korbo L., Marcussen N., Møller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Sørensen F.B., Vesterby A. 1989. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. **96** (5), 379–394.
6. Mandarin-de-Lacerda C.A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* **75** (4), 469–486.
7. Шиндерите В.С., Ясайтис А.А. 1984. Влияние ингибиторов энергетического обмена на морфометрические параметры в пространственную структуру митохондрий L-клеток. *Цитология*. **26**, 666–671.
8. Эльдаров Ч.М., Вайс В.Б., Вангели И.М., Колосова Н.Г., Бакеева Л.Е. 2015. Морфометрическое исследование ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов при старении. *Биохимия*. **80** (5), 604–609.
9. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.М., Молодых Н.А., Клиникова М.Г., Молодых О.П. 2011. Ультраструктура и стереология кардиомиоцитов при развитии регенераторно-пластической недостаточности миокарда в онтогенезе. *Бюлл. exper. биол. и мед.* **151** (1), 100–106.
10. McCallister B.D., Brown A.L. 1965. A quantitative morphological study of the mitochondria in experimental cardiac hypertrophy. *Lab. Invest.* **14**, 692–700.
11. Cieciora L., Rydzynski K., Klitonczyk W. 1979. Stereologic studies on mitochondrial configuration in different organs of the rat. *Cell Tissue Res.* **196**, 347–360.
12. Догель В.А. 1975. *Зоология беспозвоночных*. М: “Высшая школа”. 559 с.
13. Бакеева Л.Е., Скулачев В.П., Ченцов Ю.С. 1977. Митохондриальный ретикулум: строение и возможные функции внутриклеточных структур нового типа в мышечной ткани. *Вестник Московского университета, серия Биология*. **3**, 23–38.
14. Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. 1978. Mitochondrial Framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **501**, 349–369.
15. Бакеева Л.Е., Ченцов Ю.С., Скулачев В.П. 1982. Межмитохондриальные контакты кардиомиоцитов. *Цитология*. **24** (2), 161–166.
16. Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. 1983. Intermitochondrial contacts in myocardiocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **15**, 413–420.
17. Заварзин А.А. 1985. *Основы сравнительной гистологии*. Л: Изд-во Ленингр. ун-та, с. 321.

Morphometric Analysis of the Internal Ultrastructure of Mitochondria of Muscle Tissue of the Hair *Gordionus alpestris* (Nematomorpha)

C. M. Eldarov¹, V. B. Vays¹, I. M. Vangeli¹, O. A. Averina¹, B. D. Efeykin², L. E. Bakeeva^{1,*}

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru

A morphometric study of the internal ultrastructure of mitochondria of muscle tissue of the horsehair worm *Gordionus alpestris* (Nematomorpha) was carried out. As a main morphometric parameter measured, a generally accepted stereological parameter was taken, such as the surface area of the inner mitochondrial membrane per unit of the mitochondria volume, or the surface density of the inner membrane. The surface density of the inner membrane of the mitochondria of the *Gordionus alpestris* was compared with the respective parameters for mitochondria of the skeletal and cardiac muscle. It was found that the surface density of the inner membrane of the mitochondria of the horsehair worm corresponds to the values of this parameter for cardiomyocytes of mice at the age of 3 months and cardiomyocytes of Wistar rats at the age of 3 months and is even slightly higher than this parameter in mitochondria of the skeletal muscle of mice at the age of 3 months. The functional significance of a powerfully developed system of mitochondrial membranes of extended mitochondria of the horsehair worm is discussed as a structure necessary to ensure effective functioning of the contractile apparatus of the muscle tissue of the worm.

Keywords: mitochondria, ultrastructure, morphometry, obliquely striated muscle (flattened circomyarian type), horsehair worm, *Gordionus alpestris*