

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 3

Май - Июнь 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 3, 2023

ОБЗОРЫ

BAR-домен-содержащие белки как возможные регуляторы белковой жидкой фазы в нервных окончаниях в центральной нервной системе

А. Г. Шишков, Н. В. Нифантова, О. М. Коренькова, Е. С. Сопова,
Л. Бродин, О. В. Шупляков

155

Влияние акклимации растений на электронный транспорт в мембранах хлоропластов *Cucumis sativus* и *Cucumis melo*

М. А. Беньков, И. С. Сусличенко, Б. В. Трубицин, А. Н. Тихонов

172

Модель молекулярного сенсора протона вкусовых клеток

К. Д. Сладков, С. С. Колесников

188

Активация каннабиноидных рецепторов подавляет гипервозбуждение нейрональных сетей гиппокампа крысы *in vitro*

С. А. Майоров, Б. К. Кайрат, С. Г. Гайдин, А. М. Косенков, В. П. Зинченко

194

Смешанные катионные липосомы на основе *L*-аминокислот как эффективные средства доставки терапевтических молекул в клетки

З. Г. Дениева, О. О. Колоскова, А. М. Гилева, У. А. Буданова, Ю. Л. Себякин

203

Взаимодействие мезенхимных стромальных клеток из Вартонова студня пупочного канатика с первичной культурой клеток гиппокампа мышей 5XFAD при различных типах культивирования

А. В. Чаплыгина, Д. Ю. Жданова, В. И. Ковалев,
Р. А. Полтавцева, Н. В. Бобкова

217

Contents

Vol. 40, No. 3, 2023

REVIEWS

BAR Domain Proteins As Putative Regulators of the Protein Liquid Phase in Nerve Terminals
in the Central Nervous System

*A. G. Shishkov, N. V. Nifantova, O. M. Korenkova, E. S. Sopova,
L. Brodin, O. V. Shupliakov*

155

Effects of Plant Acclimation on Electron Transport in Chloroplast Membranes
of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*

M. A. Benkov, I. S. Suslichenko, B. V. Trubitsin, A. N. Tikhonov

172

Model of a Molecular Proton Sensor in Taste Cells

K. D. Sladkov, S. S. Kolesnikov

188

Activation of the Cannabinoid Receptors Suppresses Hyperexcitation
of Rat Hippocampal Neuronal Networks *in vitro*

S. A. Maiorov, B. K. Kairat, S. G. Gaidin, A. M. Kosenkov, V. P. Zinchenko

194

Mixed Cationic Liposomes Based on *L*-Amino Acids As Efficient Delivery Systems
of Therapeutic Molecules into Cells

Z. G. Denieva, O. O. Koloskova, A. M. Gileva, U. A. Budanova, Yu. L. Sebyakin

203

Interaction of Mesenchymal Stromal Cells with Primary 5XFAD Mice Hippocampus
Culture Depending on Cocultivation Method

A. V. Chaplygina, D. Y. Zhdanova, V. I. Kovalev, R. A. Poltavtseva, N. V. Bobkova

217

УДК 577.25;577.352.336;577.352.332;616.8

BAR-ДОМЕН-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ БЕЛКОВОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ В НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЯХ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

© 2023 г. А. Г. Шишков^а, Н. В. Нифантова^а, О. М. Коренькова^а,
Е. С. Сопова^{а, b}, Л. Бродин^б, О. В. Шупляков^{а, b, *}

^аСанкт-Петербургский государственный университет,
Институт трансляционной биомедицины, лаборатория биологии синапсов,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бОтдел нейронаук, Каролинский институт, Стокгольм, 17177 Швеция

*e-mail: oleg.shupliakov@ki.se

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 18.12.2022 г.

Принята к публикации 20.12.2022 г.

BAR-белки являются одними из ключевых компонентов секреторного везикулярного цикла в нервных окончаниях. Они участвуют в регуляции секреции нейромедиаторов при слиянии синаптических везикул с пресинаптической мембраной, а также в рециркуляции везикул в результате эндоцитоза. Локализация этих белков в зонах нервных окончаний, где формируются жидкие белковые фазы, предполагает дополнительные функции этих молекул. В данном обзоре мы обсуждаем функции BAR-домен-содержащих белков на различных этапах секреторного цикла, включая их возможную роль в регуляции формирования белковых жидких фаз в нервных окончаниях при синаптической активности. Мы предполагаем, что BAR-белки, помимо регуляции экзо- и эндоцитоза, играют важную роль в организации резервного пула везикул и на промежуточных этапах секреторного цикла.

Ключевые слова: синапс, цикл синаптических везикул, экзоцитоз, эндоцитоз, BAR-белки, разделение жидких фаз

DOI: 10.31857/S0233475523030088, **EDN:** FBJBWX

ВВЕДЕНИЕ

BAR-домен-содержащие белки (BAR domain proteins) широко известны как молекулы, контролирующие изменения кривизны биологических мембран. Они играют ключевую роль в жизнедеятельности всех клеточных систем. Сокращение BAR определяется первыми буквами названий трех белков, которые входят в это суперсемейство: Bin1 [1], Amphiphysin [2], обнаруженных у млекопитающих, и Rvs167, обнаруженного у дрожжей [3]. Характерной структурной особенностью BAR-белков является наличие уникального домена, состоящего из ~200–280 аминокислот, который формирует пучок альфа-спиралей, расположенных антипараллельно. При димеризации белковых молекул эти домены образуют положительно заряженную поверхность, которая способна связываться с отрицательно заряженными липидами клеточной мембраны и контролировать ее кривизну (рис. 1а, 1б) [4, 5]. Это уникальное свойство определяет участие BAR-белков во многих процессах в клетке, таких как образование внутри-

клеточных пузырьков, секреция, а также создание мембранных структур различной формы, например, Т-системы клеток скелетной мускулатуры, эндосом, филоподий, митохондрий и аутофагосом [4, 6].

Из широкого разнообразия BAR-белков выделяют три группы: N-BAR, F-BAR, I-BAR. N-BAR-белки при димеризации образуют заряженную поверхность в форме полумесяца, способную стабилизировать наибольшую кривизну мембраны [4]. Особенностью BAR-домена N-BAR-белков является N-терминальная амфипатическая спираль, которая впервые была описана для белка амфифизина [7]. Впоследствии оказалось, что такая амфипатическая спираль характерна также для эндофилина [8], нардина (RICH1) [9] и некоторых других белков. Белки, стабилизирующие меньшую кривизну поверхности мембраны, были названы по именам характерных представителей группы Fes/CIP4 homology-BAR-белков, сокращенно F-BAR-белками [10, 11]. Белки, димеры которых стабилизируют обратную кривизну мем-

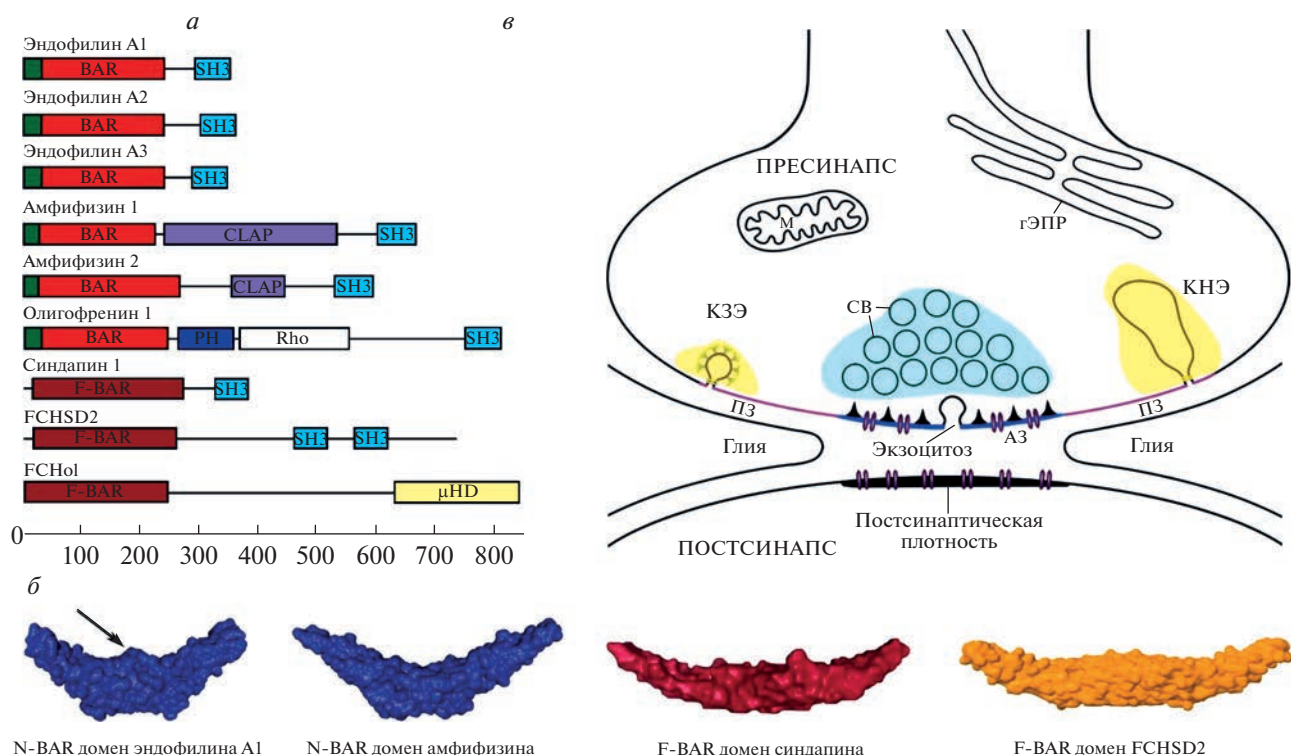


Рис. 1. BAR-белки и локализация белковых жидких конденсатов, участвующих в цикле синаптических везикул в пре-синапсе.

а — Схематическое изображение доменной организации изоформ BAR-белков, участвующих в цикле синаптических везикул. BAR-домены показаны красным, дополнительная N-терминальная амфипатическая спираль у N-BAR-белков выделена зеленым; CLAP — клатрин/AP2 связывающий участок, PH — pleckstrin homology-домен, Rho — RhoGAP-домен, регулирующий активность GTP-аз; шкала показана для оценки относительной длины аминокислотных последовательностей белков.

б — Кристаллическая структура димеров BAR-доменов некоторых белков. Показано различие в степени кривизны у N-BAR- и F-BAR-димеров. Стрелка указывает на центральную амфипатическую спираль (CAH) эндофилина.

в — Схематическое изображение локализации жидких белковых конденсатов, участвующих в цикле синаптических везикул. Жидкая белковая фаза организует кластер синаптических везикул в пре-синапсе (обозначена голубым цветом) и области периактивной зоны (ПЗ), в которых происходит клатрин-зависимый (КЗЭ) и клатрин-независимый эндоцитоз (КНЭ) (обозначены желтым цветом). Жидкая белковая фаза, организующая пре-синаптические проекции в активной зоне (АЗ), выделена синим.

СВ — синаптические везикулы, М — митохондрия, гЭПР — гладкий эндоплазматический ретикулум.

браны, получили название Inverse-BAR или I-BAR [12–14]. Группы BAR-белков различаются как углом стабилизации кривизны, так и длиной участка, взаимодействующего с клеточной мембраной, что определяет способность этих молекул формировать различные по физическим свойствам мембранные трубки и везикулы *in vitro* и *in vivo* [15–18]. В структуру BAR-белков, как правило, включены и другие домены, которые позволяют им взаимодействовать с широким спектром белков и сигнальных молекул. Так, например, в структуру BAR-белков могут входить pleckstrin homology (PH) и rhoX homology (PX) домены, позволяющие белкам осуществлять дополнительные взаимодействия с липидами, а также GEF (guanine nucleotide exchange factor) и GAP (GTP hydrolysis-activat-

ing protein) домены, регулирующие активность GTP-аз [7]. Среди дополнительных доменов наиболее часто встречаются Src homology 3 (SH3) домены, которые взаимодействуют с пролин-богатыми белковыми последовательностями — PRD [19, 20]. Это взаимодействие прежде всего играет роль в рекрутировании других белков, участвующих в различных клеточных процессах. Интересно, что SH3-домены BAR-белков обладают способностью замыкаться на пролин-богатую последовательность внутри самого белка, переводя его таким образом в неактивную форму [21–23].

В данном обзоре мы обсуждаем функции BAR-белков, непосредственно участвующих в цикле секреторных везикул в межнейронных синапсах в центральной нервной системе (ЦНС).

СЕКРЕТОРНЫЙ ЦИКЛ И РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИДКИХ ФАЗ В ХИМИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

Межнейронный химический синапс — это специализированный контакт между нервными клетками, который выполняет функцию передачи возбуждающего или тормозного сигнала между нейронами в ЦНС. Химические синапсы асимметричны по структуре и направленно передают информацию от пресинаптической к постсинаптической клетке (рис. 1а). Пресинапс и постсинапс разделены синаптической щелью шириной приблизительно 20 нм, которая окружена отростками глиальных клеток. Передача сигнала запускается потенциалом действия, приходящим в нервное окончание, и осуществляется в результате работы секреторного цикла синаптических везикул, который завершается экзоцитозом везикул и выходом нейромедиаторов в синаптическую щель. Нейромедиатор взаимодействует с рецепторами на постсинаптической мембране, активирует ионные каналы и таким образом осуществляет передачу сигнала на другой нейрон. Нейромедиаторы сконцентрированы в синаптических везикулах, или пузырьках, которые аккумулируются в кластер на специализированном участке пресинаптической мембраны, в так называемой активной зоне (рис. 1а). В состоянии покоя часть синаптических везикул в кластере связана с пресинаптической мембраной, образуя функциональный пул везикул, готовых к немедленному слиянию с пресинаптической мембраной и выбросу нейромедиатора в синаптическую щель при возникновении нейрональной активности (*readily releasable pool*). Помимо этого, существуют два дополнительных функциональных пула синаптических везикул: циркулирующий пул (*recycling pool*) и резервный пул (*reserve pool*), везикулы которых мобилизуются при умеренной и интенсивной активности нейрона соответственно [24].

Вокруг активной зоны пресинапса располагается так называемая периактивная зона, где происходит восстановление синаптических везикул после экзоцитоза (рис. 1а) [25]. Основным механизмом формирования везикул является клатрин-зависимый эндоцитоз [26, 27]. Кроме того, существуют и другие сценарии восстановления пула синаптических везикул. Известны, например, быстрый тип эндоцитоза и “*kiss-and-run*”, которые реализуются без участия клатрина и происходят как в периактивной, так и в активной зоне [28–31]. При высоком уровне синаптической активности, который сопровождается экзоцитозом большого количества везикул в короткий промежуток времени, может происходить компенсаторный захват и отпочковывание больших

участков мембраны по типу “*bulk*”-эндоцитоза. Это приводит к формированию эндосом, из которых в дальнейшем формируются синаптические везикулы [32]. Следует отметить, что эти механизмы эндоцитоза являются вспомогательными и оказываются не в состоянии поддерживать работу синаптического цикла при выключении классического клатрин-зависимого эндоцитоза [27]. Вновь сформированные везикулы заполняются нейромедиатором, транспортируются в область кластера над активной зоной и вновь вовлекаются в процесс экзоцитоза, замыкая таким образом синаптический секреторный цикл [33–35].

Открытие жидких белковых конденсатов и процессов разделения и трансформации жидких фаз (*liquid-liquid phase transitions*, LLPTs) в клетках во многом изменило наши представления о механизмах клеточных процессов [36, 37]. Как показали исследования последних лет, пресинаптические компартменты, в которых происходит цикл синаптических везикул, также организованы по принципу разделения жидких фаз [38] (рис. 1а). Способность в определенных условиях формировать поверхность раздела фаз *in vitro* демонстрируют: основной белок резервного пула синапсин [39, 40], белки пресинаптического уплотнения RIM, RIM-BP и ELKS в комплексе с потенциал-зависимыми кальциевыми каналами (VGCC) [38, 41–44], а также белки-инициаторы клатрин-зависимого эндоцитоза FCHO 1/2 и eps15 [45] и клатрин-независимого эндоцитоза синдапин 1 и динамин 1xA [46]. Примечательно, что синаптические везикулы по-разному взаимодействуют с жидкой фазой синапсина и жидкой фазой RIM/RIM-BP/ELKS, инкапсулируясь в первой и распределяясь по поверхности раздела фаз второй [47]. Взаимодействуют между собой и сами жидкие фазы синапсина и RIM/RIM-BP или RIM/ELKS. Вне зависимости от порядка добавления белков в смесь жидкая фаза синапсина инкапсулирует белковые капли, образованные RIM/RIM-BP и RIM/ELKS, но не смешивается с ними, то есть образуется структура вида “жидкая фаза внутри жидкой фазы”. Авторам работы удалось сконструировать такую организацию жидких фаз *in vitro*. Жидкая фаза белков RIM/RIM-BP, которая формировалась на мембране гигантской униламеллярной везикулы со встроенными в нее VGCC, связывала на своей поверхности синаптические везикулы, и сама была инкапсулирована жидкой фазой синапсина с включенными в нее везикулами. Эти эксперименты поддерживают гипотезу, что такое разделение жидких фаз существует и в живом синапсе [47].

Молекулярной основой перехода белков в состояние жидкой фазы являются слабые электростатические взаимодействия между аминокислотными остатками их неорганизованных участков (*intrinsically disordered regions*, IDR), которые при определенных условиях становятся для молекул энергетически более выгодными, чем взаимодействие IDR с молекулами растворителя. На возможность этого перехода влияют такие факторы, как pH, температура, ионная сила раствора и посттрансляционные модификации белков (за счет изменения распределения зарядов в IDR) [48]. Необходимым условием образования жидкой фазы также является преодоление белками концентрационного порога, чему способствует явление “молекулярного краудинга” — присутствие в среде других высокомолекулярных соединений, конкурирующих с белками за молекулы растворителя. Кроме того, пороговые концентрации белков могут достигаться локально за счет их взаимодействия с другими молекулами. Так, в экспериментах *in vitro* показано, что жидкая фаза белков активной зоны RIM/RIM-BP/ELKS образуется при более низких концентрациях этих белков в присутствии VGCC, с которыми RIM взаимодействует напрямую через PDZ-домен (комбинация первых букв названий белков PSD95, Dlg1, Z0-1), а RIM-BP — через SH3-домены [42].

RIM/RIM-BP/ELKS способны вступать в специфические взаимодействия друг с другом, но не с синапсином. Жидкие фазы RIM/RIM-BP/ELKS и синапсина обладают разной плотностью и, соответственно, различаются по силе поверхностного натяжения на границе раздела фаз, что объясняет, почему они не смешиваются [47].

Взаимодействие синаптических везикул с жидкими фазами, вероятно, определяется их взаимодействием с белками, входящими в состав фазы. Так, синапсин напрямую связывается с мембраной везикул с помощью мотива в консервативном домене C и ALPS (*amphipathic lipid-packing sensor*) мотива, а эндоцитозные белки — с помощью своих BAR-доменов [7, 49]. Важную роль в концентрации белков, образующих жидкую фазу, имеют трансмембранные белки синаптических везикул, например, синаптофизин [50]. Таким образом, синаптические везикулы оказываются непосредственно внутри жидкой фазы этих белков в момент ее образования. В то же время белки RIM/RIM-BP/ELKS не имеют доменов, способных напрямую связываться с мембранными липидами, что снижает вероятность включения везикул в жидкую фазу.

В процессе синаптического цикла везикулы преодолевают разделы жидких фаз, организация

и белковый состав которых меняется в зависимости от уровня синаптической активности (рис. 1). Раздел фаз позволяет происходить диффузии молекул между жидкими белковыми конденсатами и цитозолем, однако является непроницаемым для крупных молекулярных комплексов и органелл [48, 51]. Ряд белков, присутствующих в таком компартменте, выступает в роли регуляторных, изменяя условия образования жидкой фазы [52]. Свойства BAR-белков позволяют предполагать, что эта группа белков участвует в организации жидких фаз в синапсе в качестве регуляторных молекул, которые наряду с известными функциями в процессах экзо- и эндоцитоза способствуют переходу везикул в различные пресинаптические компартменты по ходу секреторного цикла.

BAR-БЕЛКИ СИНАПТИЧЕСКОГО ВЕЗИКУЛЯРНОГО ЦИКЛА

В настоящее время известно шесть BAR-белков, участвующих в работе цикла синаптических везикул — это N-BAR-белки: амфифизин, эндофизин; F-BAR-белки: синдапин, FCHo и FCHSD, а также BAR-белок олигофренин. Данных об участии I-BAR-белков в синаптическом цикле в настоящее время нет [14]. Исследования последних лет показали, что в работе цикла участвуют определенные изоформы BAR-белков, а именно: амфифизины 1/2, эндофизин A1, олигофренин 1, синдапин 1, FCHo 1/2 и FCHSD 1/2 [53, 54]. Участие данных изоформ предположительно определяется кинетическими свойствами самого цикла, основным из которых является высокая скорость и эффективность секреторного процесса [53–55].

Амфифизины 1/2. Амфифизины 1/2 в геноме человека кодируются двумя разными генами, *AMPH* и *BIN1* (NCBI Gene ID: 273, 274) (рис. 1a). Амфифизин 1 преимущественно экспрессируется в ЦНС [56] и является ключевым белком синаптического цикла [55]. Амфифизин 2, также носящий названия SH3P9 и BIN1 (*bridging integrator-1*), экспрессируется и в других тканях, например, в мышцах [57, 58].

В структуру амфифизина 1/2 входят три основных домена: N-терминальный BAR-домен, клаатрин/AP2-связывающий домен (CLAP) и C-терминальный SH3-домен [59]. N-BAR-домены белка при димеризации образуют структуру в форме дуги (рис. 1б) [7]. Такая структура обладает свойством стабилизировать кривизну мембраны путем связывания с отрицательно заряженной поверхностью липидного слоя мембраны [60]. CLAP-домен амфифизина 1 взаимодействует с ключевыми белками клаатрин-зависимого эндо-

цитоза — адаптерным комплексом AP2 и кластрином [59]. С-терминальный SH3-домен амфифизина обладает способностью рекрутировать другие белки, имеющие в своей структуре пролин-богатые последовательности (PRD) [61]. Амфифизины 1/2 могут образовывать гомо- и гетеродимеры [62].

Амфифизины обладают внутримолекулярным механизмом, который переводит белок в неактивную форму в результате замыкания SH3-домена на BAR-домен [22, 23, 63]. Показано, что SH3-домен способен связываться с пролин-богатой последовательностью H0-спирали N-BAR-домена, что приводит к изменению конформации белка, в результате чего он теряет способность участвовать в тубуляции мембран и снижается эффективность его связывания с мембранными липидами [63]. Это свойство предполагает наличие механизмов регуляции активности белка, в частности, посредством фосфорилирования—дефосфорилирования. Исследования на синапсоматомах показали, что Cdk5-киназа фосфорилирует амфифизин 1 при синаптической активности [64]. При эндоцитозе происходит дефосфорилирование амфифизина [64–66]. Предполагается, что это осуществляется с помощью Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой фосфатазы кальциневрина (CaN) [66].

Эндофилин A1. В геноме млекопитающих присутствуют три гена *SH3GL1–3* (NCBI Gene ID: 6455, 6456, 6457; *Homo sapiens*), кодирующих эндофилины A1–A3, и два гена *SH3GLB1, 2* (NCBI Gene ID: 56904, 54673; *Homo sapiens*), кодирующих эндофилины B1 и B2 (рис. 1а). Эндофилин A1 специфичен для ЦНС, эндофилин A2 экспрессируется во всех тканях, эндофилин A3 найден в мозге и семенниках [67–69]. Эндофилины B1 и B2 экспрессируются во всех тканях, включая мозг [16]. В нервных терминалях эндофилины A ассоциированы с синаптической мембраной [19]. Эндофилины B преимущественно обнаружены в ассоциации с такими мембранными органеллами, как митохондрии, аутофагосомы, лизосомы и эндоплазматический ретикулум (ЭПР) [70–72]. На поверхности некоторых органелл, например, аутофагосом, эндофилины A колокализуются с эндофилинами B [71, 72].

Определение кристаллической структуры эндофилина показало, что белки включают в себя два основных домена: N-терминальный BAR-домен и С-терминальный SH3-домен, соединенные вариabельным участком [8]. Эндофилин — единственный из N-BAR-белков, имеющий дополнительную H1-вставку (H1I) в структуре N-BAR-домена. При димеризации благодаря наличию этой вставки на поверхности белка, обращенной

в сторону мембраны, образуется центральная амфипатическая спираль (central amphipathic helix — САН) [8, 69] (рис. 1б). Эта особенность структуры позволяет эндофилинам не только стабилизировать, но и активно генерировать кривизну мембраны: САН встраивается в липидный слой, задавая его асимметрию и, соответственно, кривизну [9].

Центральный участок эндофилина A1 может подвергаться фосфорилированию, что влечет за собой изменение радиуса кривизны мембранных структур, которые этот белок стабилизирует *in vitro* [73]. Предполагается, что BAR-белки переходят в активное состояние при дефосфорилировании кальциневрином. В соответствии с этим предположением, повышенная протеинкиназная активность и фосфорилирование BAR-белков в синаптической терминали приводит к снижению эффективности эндоцитоза [74].

Известно, что эндофилин, как и амфифизин, обладает внутримолекулярным механизмом замыкания, который регулируется посттрансляционными модификациями белка [23, 75]. SH3-домен также способен связываться с H0-спиралью N-BAR-домена, что приводит к конформационным изменениям в BAR-домene [23].

Олигофренин 1. Олигофренин 1 кодируется геном *OPHN1* (NCBI Gene ID: 4983; *Homo sapiens*) и представляет собой RhoGAP-белок, регулирующий активность GTP-аз семейства Rho. Олигофренин 1 экспрессируется в ЦНС и присутствует как в нервных терминалях, так и в дендритах нейронов [76]. Структура белка включает BAR-домен, расположенный на N-конце, PH-домен, центральный RhoGAP-домен и SH3-домен на С-конце молекулы [77, 78]. Белок участвует как в цикле синаптических везикул [78], так и в морфогенезе дендритных шипиков [79]. Для олигофренина не описано механизма аутоингибирования. Мутации белка связывают с развитием X-сцепленной умственной отсталости у человека [76].

Синдапин 1. В геноме млекопитающих присутствуют три гена F-BAR-белка синдапина (*PACSIN1–3*), кодирующих три его изоформы — синдапины 1–3 (NCBI Gene ID: 29993, 11252, 2976; *Homo sapiens*). Синдапин 1 экспрессируется исключительно в ЦНС и аккумулируется в нервных окончаниях. Синдапин 2 обнаруживается во всех тканях и органах. Экспрессия синдапина 3 наиболее высока в скелетной и сердечной мускулатуре, но также выявляется в легких, почках, мозге, плаценте, поджелудочной железе [80].

Мономер синдапина 1 включает F-BAR-домен, вариabельный участок и С-концевой SH3-домен. Рентгеноструктурный анализ показал, что

в целом структура F-BAR-домена синдапина схожа с таковой у других F-BAR-белков. F-BAR-домен у димера синдапина имеет меньшую кривизну поверхности, чем у N-BAR-доменов димеров эндофилина и амфифизина. На границе центрального и дистального участков F-BAR-домена синдапина также находятся гидрофобные петли, позволяющие синдапинам 1 и 2 активно изменять кривизну мембраны [81, 82].

Синдапин 1, так же как эндофилин A1 и амфифизины 1 и 2, способен к аутоингибированию, при котором его SH3-домены взаимодействуют с F-BAR-доменом, блокируя часть его мембраносвязывающей поверхности. Однако взаимодействие доменов происходит не через каноническое SH3/PRD-взаимодействие, а за счет формирования водородных связей и солевых мостиков, поэтому является чувствительным к pH и ионной силе раствора [82]. Хотя синдапин 1 имеет сразу несколько сайтов фосфорилирования, преимущественно расположенных на N-конце F-BAR-домена и вариабельном участке, ни один из этих сайтов не обладает свойством регулировать состояние аутоингибирования синдапина. Вместо этого, выход синдапина из аутоингибирования регулируется взаимодействием пролин-богатых последовательностей других белков с его SH3-доменами, например, динамина, в результате которого димер меняет конформацию и вновь приобретает способность связываться с мембраной [83].

FCHSD1/2. Геном позвоночных содержит два гена белков FCHSD (F-BAR and double SH3 domains protein): *FCHSD1* и *FCHSD2* (NCBI Gene ID: 89848, 9873; *Homo sapiens*) [84]. Преобладающей изоформой является *FCHSD2*, экспрессия которого выявляется почти во всех тканях, в частности, в коре мозга, мозжечке, почках, печени, семенниках, в то время как *FCHSD1* экспрессируется на гораздо более низком уровне [85].

В структуру FCHSD1/2 входят N-концевой F-BAR-домен, два SH3-домена и C-концевой пролин-богатый участок. Важное отличие FCHSD1/2 от других F-BAR-белков состоит в том, что их мембраносвязывающая поверхность имеет нулевую кривизну, то есть FCHSD1/2 могут связываться с плоскими участками мембраны и не способны к ее тубуляции [86]. Показано, что гомолог FCHSD2 у дрозофилы, Nervous Wreck, обладает внутримолекулярным механизмом замыкания, подобным механизму аутоингибирования синдапина. При этом SH3-домены белка (главную роль в этом играет SH3b-домен) связываются с положительно заряженными участками на концах F-BAR-домена за счет электростатических взаимодействий. Интересно, что взаимодей-

ствие SH3- и F-BAR-доменов у данного белка может не только уменьшать взаимодействие с мембраной, но и приводить к образованию различных олигомеров на ее поверхности при изменениях заряда липидной мембраны [21]. Как работает механизм аутоингибирования FCHSD2 у млекопитающих, еще предстоит выяснить.

FCHo1/2. В геноме млекопитающих присутствуют два гена белков FCHo (сокращение от англ. Fer/Cip4 homology domain-only): *FCHo1* и *FCHo2* (NCBI Gene ID: 23149, 115548; *Homo sapiens*), кодирующих две соответствующие изоформы белка. Экспрессия обеих изоформ обнаруживается во множестве органов и тканей, однако в мозге *FCHo1* показывает более высокий уровень экспрессии, чем *FCHo2* [87].

FCHo-белки имеют в составе F-BAR-домен и μ HD-домен, соединенные неупорядоченным линкерным участком [88]. F-BAR-домен у димера FCHo имеет небольшую кривизну мембраносвязывающей поверхности и S-образную форму, однако менее выраженную, чем у синдапина [89]. Для FCHo-белков не описано механизма аутоингибирования.

Важно отметить, что в аминокислотных последовательностях у многих BAR-белков наблюдаются IDRs, которые могут участвовать в формировании жидкой белковой фазы [90]. Взаимодействие с мембраной везикул, наличие IDRs и SH3-доменов и способность к аутоингибированию являются значимыми аргументами в пользу того, что данные молекулы могут регулировать состояние белковых жидких фаз в нервной термине.

ФУНКЦИИ BAR-БЕЛКОВ В ЦИКЛЕ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ЖИДКОЙ ФАЗЫ

BAR-белки в синаптическом цикле были исходно идентифицированы как молекулы, участвующие в процессе эндоцитоза. Дальнейшие исследования показали, что BAR-белки в синапсах также играют важную роль на других этапах синаптического цикла, от сопряжения процессов экзо- и эндоцитоза до возвращения везикул в кластер в активной зоне. Считается, что некоторые BAR-белки постоянно присутствуют в периактивной зоне, а ряд BAR-белков находится в кластере синаптических везикул в состоянии покоя и мигрирует в периактивную зону при синаптической активности [59, 91–93]. Так, эндофилин, амфифизин и синдапин локализованы в кластерах синаптических везикул, организованных жидкой фазой синапсина, над активной зоной, и

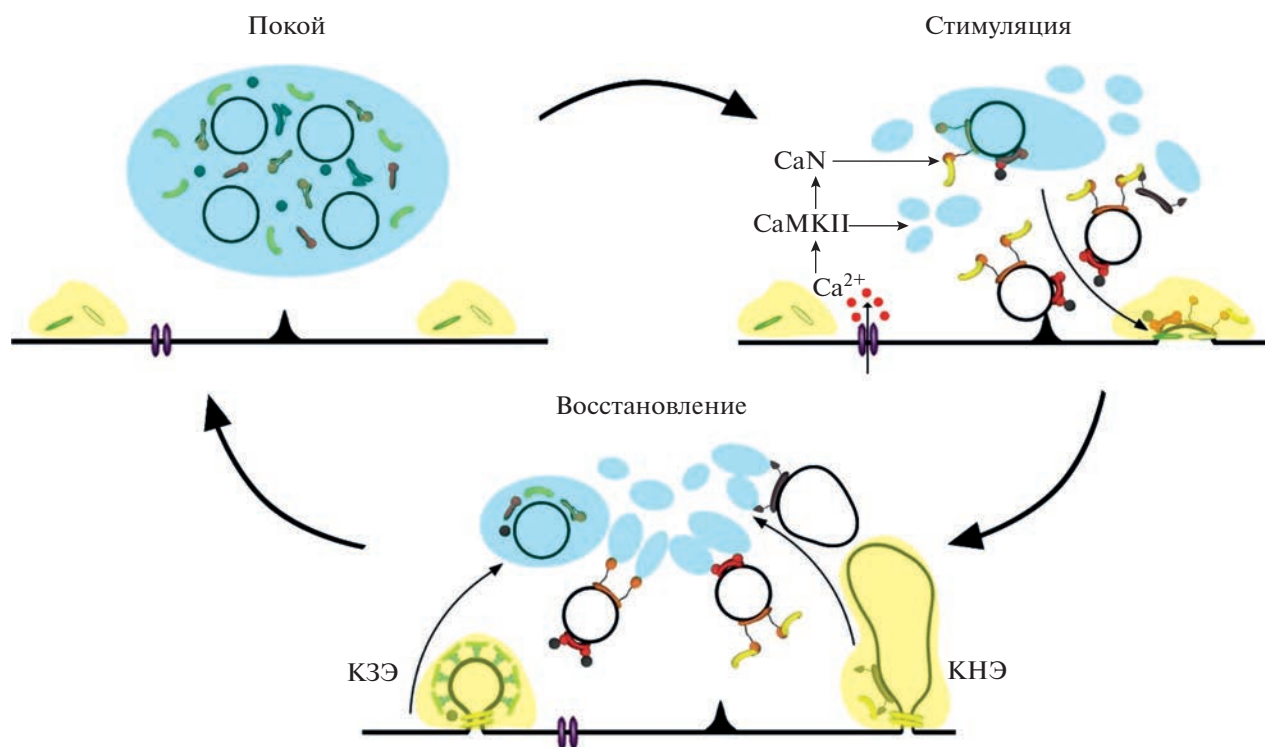


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая участие BAR-белков в регуляции жидких белковых фаз, образующихся на различных этапах синаптического цикла.

Слева в верхней части схемы показана организация резервного пула в состоянии покоя. BAR-белки находятся в мономерном аутоингибированном состоянии и стабилизируют жидкую фазу синапсина, организующую везикулы в кластер. F-BAR-белки (FCHo, FCHSD и частично синапсин) локализованы в периактивной зоне.

При стимуляции (справа) вход кальция через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы приводит к фосфорилированию синапсина с помощью CaMKII и разрушению жидкой фазы в кластере. N-BAR-белки подвергаются дефосфорилированию и димеризации, что приводит к взаимодействию с мембраной синаптических везикул и с другими эндоцитозными белками, например с динамином и синаптоянином, которые также локализуются в кластере в состоянии покоя. Динамин при этом может одновременно и связывать синапсин, и взаимодействовать с амфифизином, находящимся на мембране везикул. Везикулы перемещаются в активную зону и сливаются с пресинаптической мембраной. BAR-белки, участвующие в регуляции этих стадий, находятся в растворимом состоянии в аксоплазме.

При эндоцитозе (внизу) BAR-белки снова включаются в состав жидкого белкового конденсата в периактивной зоне (желтая). При отпочковывании везикул от мембраны с помощью GTP-азы динамина происходят посттрансляционные модификации белков и разрушение жидкой фазы. BAR-белки взаимодействуют с синапсином, что приводит к увеличению его локальной концентрации. Дефосфорилирование синапсина и последующее усиление его взаимодействия с везикулами приводят к замещению BAR-белков на поверхности везикул и формированию жидкой фазы. Посттрансляционные изменения и образование аутоингибированных мономеров BAR-белков приводят к стабилизации жидкой фазы и организации везикул в кластер. Подробности в тексте.

Большие стрелки указывают направление синаптического цикла. Голубым цветом показана жидкая фаза синапсина, оранжевым — амфифин, красным — эндофин А, серым — синапсин I, желтым — динамин, зеленым — FCHo и FCHSD, фиолетовым — потенциал-зависимые кальциевые каналы, красными кружками — ионы кальция, серыми кружками — синаптоянин. CaMKII — Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, CaN — кальциневрин, КЗЭ — клатрин-зависимый эндоцитоз, КНЭ — клатрин-независимый эндоцитоз.

при синаптической активности доставляются в периактивную зону пресинапса после слияния везикул с мембраной в активной зоне [59, 91–94]. Вместе с названными BAR-белками мигрирует и целый ряд эндоцитозных белков, таких как динамин, синаптоянин и интерсектин [91, 95, 96]. При этом белки подвергаются дефосфорилированию кальциневрином (CaN) [53, 66, 91–93] (рис. 2).

В связи с имеющимися данными о свойствах обсуждаемых белков возникает вопрос: каким об-

разом BAR-белки осуществляют свои функции в пресинаптическом секреторном цикле и участвуют в регуляции LLPTs?

Пресинаптические BAR-белки в состоянии покоя.

Как уже отмечалось ранее, синаптические везикулы организованы в кластер жидкой фазой пресинаптического белка синапсина. Эксперименты *in vitro* показали, что жидкая фаза синапсина образуется благодаря слабым взаимодействиям между IDR молекул белка [39]. Для этого его вза-

имодействие с SH3-доменами BAR-белков должно быть нарушено. В пользу этого говорят эксперименты, которые показывают, что введение антител к IDR синапсина нарушает организацию резервного пула везикул в пресинапсе миогии в покое [40]. Можно предположить, что дефосфорилирование синапсина и его последующее взаимодействие с мембраной везикул с помощью ALPS-мотива и C-домена в жидкой фазе приводит к смещению BAR-белков с поверхности мембраны и к их переходу в мономерное закрытое состояние или, как в случае с эндофилином, белок может находиться в связанном состоянии с VGLUT1 (везикулярным транспортером глутамата) [97]. В пользу инактивации SH3-взаимодействий говорит эксперимент, в котором блокирование антителами SH3-доменов амфифизина и SH3A-домена интерсектина не приводит к разрушению резервного пула в покое [40]. При этом наличие IDRs в структуре BAR-белков может способствовать поддержанию жидкой фазы синапсина, как это было показано для других белков [98–100]. С этим также согласуется предположение, что SH3-домены других эндоцитозных белков в сформированной жидкой фазе синапсина не активны [101].

Эксперименты показали, что синапсин при возникновении синаптической активности подвергается комплексному фосфорилированию [39, 53, 102] (рис. 2). Фосфорилирование с помощью кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMK II) вызывает переход белка (LLPT) из состояния жидкой фазы в растворимую форму, позволяя синаптическим везикулам мигрировать в активную зону пресинапса [39]. Дефосфорилирование BAR-белков кальций/кальмодулин-зависимой фосфатазой — кальциневрином (CaN) при этом переводит их в активное состояние, способствующее переходу в активную и затем в периактивную зоны [53, 54, 66, 91].

Экзоцитоз. Исследования последних лет позволяют предполагать участие BAR-доменов-содержащих белков в различных этапах экзоцитоза в пресинапсе, включая формирование поры при слиянии везикул с пресинаптической мембраной. Так, повышенная экспрессия эндофилина увеличивает вероятность высвобождения нейромедиатора [103]. На примере глутаматергических нейронов коры головного мозга крысы было показано, что взаимодействие эндофилина A1 с везикулярным транспортером глутамата VGLUT1 снижает эффективность экзоцитоза [97]. В основе этого взаимодействия лежит сродство пролин-богатой последовательности VGLUT1 к SH3-домену эндофилина A1. Таким образом, VGLUT1

связывает мономеры эндофилина A1, снижая количество “активного” эндофилина на поверхности мембраны везикул, участвующих в синаптическом цикле.

Кроме того, взаимодействие SH3-домена эндофилина может являться важным фактором в процессе положительной регуляции экзоцитоза. Так, синаптический скаффолд-белок интерсектин связывается с эндофилином в результате взаимодействия их SH3-доменов [104]. Предполагается, что эндофилин-интерсектиновый комплекс играет важную роль в экзоцитозе. Подтверждение этой гипотезы было получено в работе на хромаффинных клетках надпочечников, которые используют везикулы, подобные таковым в синапсах, для секреции биологически активных молекул. Было показано, что эндофилины A1 и A2 действуют в тандеме с интерсектином, увеличивая вероятность выделения медиатора [105]. Была выдвинута гипотеза, что механизм такой стимуляции осуществляется через взаимодействие интерсектина с белками SNARE, которое регулируется эндофилином. Требуется дополнительное исследование, чтобы подтвердить, работает ли данный механизм в межнейронных синапсах.

Вероятная роль амфифизина 1 в экзоцитозе была показана на синапсосомах, изолированных из мозга мышей. В экспериментах по оценке эффективности выделения флуоресцентного красителя, загруженного в везикулы, было выявлено, что в случае нокаута по гену амфифизина 1 (при котором также наблюдается пониженная экспрессия амфифизина 2) интенсивность экзоцитоза существенно снижается по сравнению с диким типом [55]. Также участие амфифизина 1 в экзоцитозе получило подтверждение в модельных экспериментах со слиянием везикул с пресинаптической мембраной в нейроэндокринных клетках. Это исследование указало на непосредственное рекрутирование амфифизина 1 в зону слияния везикул [106].

Олигофренин 1 является еще одним BAR-белком, роль которого связана с регуляцией экзоцитоза в центральных синапсах. Опыты на гиппокампальных культурах нейронов мышей показали, что данный белок повышает вероятность слияния синаптических везикул с мембраной [107]. Кроме того, предполагается, что он играет роль в сопряжении процессов экзо- и эндоцитоза. С одной стороны, олигофренин 1 инактивирует сигнальный путь RhoA/ROCK, который, в свою очередь, подавляет эндоцитоз посредством фосфорилирования эндофилина [77]. С другой стороны, PRD-участок олигофренина 1 непосредственно взаимодействует с SH3-доменом эндофилина A1, и

нарушение этого взаимодействия при мутациях в PRD-домене олигофренина 1 приводит к замедлению рециркуляции синаптических везикул [78]. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого явления, был недавно подробно проанализирован [108]. Было высказано предположение, что олигофренин 1 связан с образованием поры при слиянии везикулы с пресинаптической мембраной через GAP-домен и контролирует последующий захват мембраны везикул при помощи BAR-домена. Таким образом, белок обеспечивает пространственное и временное сопряжение экзоцитоза и эндоцитоза.

Эндоцитоз. При восстановлении синаптических везикул в периактивной зоне белковые комплексы, участвующие в различных формах эндоцитоза, вновь формируют жидкую фазу (рис. 2). Как уже упоминалось, одним из ключевых механизмов восстановления синаптических везикул является клатрин-зависимый эндоцитоз, который инициируется на участках пресинаптической мембраны, насыщенных фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом ($PI(4,5)P_2$). Эндоцитоз протекает в несколько стадий, в результате которых синаптическая везикула отпочковывается от мембраны. BAR-белки являются ключевыми участниками этого процесса. Ряд исследований позволяет предполагать, что некоторые F-BAR-белки могут постоянно присутствовать в периактивной зоне и рекрутироваться к местам эндоцитоза комплексами белков, связанными с везикулярной мембраной, насыщенной $PI(4,5)P_2$ [46, 109]. Первыми среди F-BAR-белков к области формирования будущего пузырька рекрутируются белки FCHo1/2, которые в свою очередь привлекают к сайту эндоцитоза белки eps15 и интерсектин [110]. Исследования *in vitro* показали, что гомодимеры FCHo2 формируют на поверхности мембраны кольцеобразные структуры, сопоставимые по размерам с сайтами клатрин-зависимого эндоцитоза, что способствует кластеризации молекул $PI(4,5)P_2$ [111]. Кроме того, линкерный участок FCHo1/2 способен взаимодействовать с адаптерным белком AP2, что также приводит к его кластеризации в составе мембраны и дестабилизации его закрытой конформации. После этого $PI(4,5)P_2$, а также клатрин и другие эндоцитозные белки начинают конкурировать с FCHo1/2 за связывание с AP2, что ведет к переходу адаптерного белка в открытую конформацию и запуску последующих этапов эндоцитоза [112]. Предполагается, что жидкая фаза может формироваться на самых начальных этапах сборки клатрин-окаймленной ямки [45].

Эндофилин и амфифизин рекрутируются в зону формирования клатрин-окаймленной ямки

уже на ранних стадиях эндоцитоза [113]. Так, введение антител против эндофилина введет к остановке эндоцитоза в периактивной зоне в гигантском аксоне миогли на начальных стадиях инвагинации мембраны клатрин-окаймленной ямки [114], а введение антител против CLAP-домена амфифизина — к нарушениям формы клатриновых пузырьков, что также указывает на нарушение сборки клатриновой оболочки на ранних стадиях [59].

Эксперименты, проведенные на живых организмах, и модельные эксперименты с использованием липосом *in vitro* показали активное участие N-BAR-белков эндофилина A1 и амфифизина 1/2 на стадиях отпочковывания везикул от мембраны и снятия клатриновой оболочки [53, 54]. Например, при нарушении взаимодействия амфифизина с динамином в гигантском синапсе миогли в результате введения SH3-домена амфифизина происходит накопление сокращенных клатрин-окаймленных ямок в периактивной зоне [20]. В то же время, при избыточной экспрессии SH3-доменов эндофилина в пресинапсе, наряду с аккумуляцией сокращенных клатрин-окаймленных ямок вокруг активной зоны, также обнаруживаются многочисленные везикулы, покрытые клатриновой оболочкой [115]. Тройной нокаут генов эндофилина A1–A3 у мышей также приводит к накоплению клатрин-окаймленных везикул в аксоплазме [116]. Эндофилин имеет родство как к динамину, так и к синаптоянину, участвующему в процессе снятия клатриновой оболочки с везикул [19, 116]. Вместе эти данные указывают на решающую роль амфифизина на стадиях подготовки к срезанию клатрин-окаймленной ямки с поверхности мембраны, а эндофилина — в рекрутировании синаптоянина и последующем снятии клатриновой оболочки у вновь сформированных везикул.

Амфифизин взаимодействует с пролин-богатым участком динамина с помощью SH3-домена, рекрутируя GTP-азу для полимеризации вокруг шейки клатрин-окаймленной ямки для последующего отпочковывания везикулы от мембраны [20, 53]. Это происходит в результате механохимической активности динамина [117]. После отпочковывания везикулы происходит быстрое снятие ее клатриновой оболочки. В этом процессе участвует полиинозитолфосфатаза синаптоянин [53, 118]. Синаптоянин рекрутируется SH3-доменом эндофилина и осуществляет гидролиз $PI(4,5)P_2$ до $PI4P$, вследствие чего происходит отсоединение всех адаптерных белков с поверхности пузырька, и создается платформа для рекру-

тирования ауксина и других молекул, участвующих в разборке клатриновой оболочки [53, 119].

Недавнее исследование также показало, что интерсектин через SH3—SH3-взаимодействие рекрутирует в основание клатрин-окаймленной ямки F-BAR-белок FCHSD2, который связывается с плоскими участками мембраны в основании ямки, и запускает полимеризацию актина, опосредованную активацией N-WASP и Arp2/3. Предположительно, полимеризация актина, направленная от основания ямки к клатриновой оболочке будущей везикулы, облегчает протекание финальных этапов клатрин-опосредованного эндоцитоза [86]. Важно отметить, что гомолог этого белка в нервно-мышечных синапсах дрозофилы, Nervous Wreck (NWK), локализуется исключительно в периактивной зоне в процессе синаптического цикла, что позволяет предполагать аналогичную локализацию FCHSD2 в центральных синапсах [86]. Нарушение рекрутирования NWK к местам сборки везикул приводит к нарушению размера пузырьков, что указывает на важную роль этого F-BAR-белка уже на ранних стадиях эндоцитоза [120].

BAR-белки участвуют также в других неклассических сценариях эндоцитоза. Так, было показано, что эндофиллин А вовлечен в рециркуляцию синаптических везикул посредством сверхбыстрого эндоцитоза (ultrafast endocytosis) [28–30] и быстрого эндофиллин-опосредованного эндоцитоза (fast endophilin-mediated endocytosis — FEME) [121–123, обзор 124]. Кроме того, было обнаружено участие в сверхбыстром эндоцитозе синдапина 1, который, как показали эксперименты на первичных культурах нейронов и с изолированными белками, выступает в качестве адаптера между пресинаптической мембраной и молекулами сплайс-изоформы динамина Dyn1xA с образованием белкового конденсата, или жидкой фазы. Предполагается, что таким образом происходит подготовительное локальное накопление динамина в зоне эндоцитоза, что ускоряет кинетику процесса [46].

Синдапин 1 также играет важнейшую роль в процессе bulk-эндоцитоза. В экспериментах на гигантских аксонах миноги, а также на первичных культурах нейронов млекопитающих, было продемонстрировано, что для протекания bulk-эндоцитоза необходимо не только присутствие функционально активного синдапина, но и его взаимодействие с динамином 1 [82, 94]. Условием этого взаимодействия является дефосфорилирование динамина 1 со стороны Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой фосфатазы кальциневрина [125]. Блокирование взаимодействия кальциневрина с

динамином 1 приводит к нарушению формирования синаптических везикул на поверхности bulk-эндосом и невозможности восстановления резервного пула [126].

Формирование пресинаптического кластера везикул. Есть основания полагать, что после отпочковывания везикул от пресинаптической мембраны и снятия клатриновой оболочки такие белки, как эндофиллин и амфифизин, остаются на поверхности везикул (рис. 2). Не исключено, что синдапин попадает в кластер с везикулами большего диаметра, образованными в процессе клатрин-независимого эндоцитоза [46]. Интересным свойством SH3-доменов эндофиллина, амфифизина и синдапина является способность взаимодействовать с синапсином [127–129]. Эти взаимодействия могут способствовать увеличению локальной концентрации синапсина на поверхности вновь сформированных везикул для последующего перехода синапсина в жидкую фазу. Четких подтверждений роли BAR-белков в восстановлении кластера везикул при синаптической активности в настоящее время нет. Требуются дальнейшие исследования для выяснения детальных механизмов участия этих белков. В поддержку нашей гипотезы говорят эксперименты, в которых нокаут генов эндофиллина сопровождается уменьшением размеров кластеров синаптических везикул в синапсах [116], однако этому могут быть и другие объяснения, связанные, например, с нарушениями работы эндоцитоза. Выключение генов амфифизина 1 и синдапина 1 существенно не влияют на организацию кластеров синаптических везикул в нервных окончаниях [55, 130]. Не исключено, что функции белков дублируются, поскольку на этом этапе секреторного цикла работают и другие пресинаптические молекулы. Функцию концентрации синапсина у активной зоны пресинапса выполняет, например, скаффолд-белок интерсектин, который имеет кассету из SH3-доменов и может образовывать мультимерные комплексы, связывающие синапсин [39, 40, 101, 131]. Биохимические опыты показали, что в случае интерсектина взаимодействие с синапсином возможно только в условиях, стимулирующих фосфорилирование белков. Это позволяет предположить, что синапсин связывается с SH3-доменами в фосфорилированном состоянии [101, 131].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научные эксперименты, проведенные в последние годы, указывают на то, что BAR-белки участвуют в работе синаптического секреторного цикла на многих его этапах. Способность некото-

рых синаптических белков претерпевать фазовый переход из раствора в жидкую фазу с особыми свойствами коренным образом изменила наши представления о принципах работы синаптического секреторного цикла. Целый ряд гипотез, высказанных в данном обзоре, требует дополнительного подтверждения. Следует отметить, что функции BAR-белков в нервных окончаниях не ограничиваются циклом синаптических везикул. Так, показано участие эндофилинов в аутофагии и модификациях митохондриальной мембраны [71, 72, 132–134]. Амфифизины и NWK/FCHCD2 могут участвовать в сопряжении мембранных процессов с перестройкой цитоскелета [86, 109, 135, 136]. Новые данные указывают на участие LLPTs и в этих процессах [137–139]. Дальнейшие исследования роли LLPTs в центральных синапсах будут способствовать более широкому пониманию клеточных механизмов, обеспечивающих передачу сигналов в нервных окончаниях, и потенциальных источников развития патологий в центральной нервной системе.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-15-00227) и Шведского Совета по научным исследованиям (The Swedish research Council, grants 2020-01731, 2020-01952), а также грантов СПбГУ (ID 93026594) и Шведского фонда исследований мозга (Hjärnfonden).

Соответствие принципам этики. Все работы, цитируемые в обзоре, выполнены с соблюдением международных, национальных и/или институциональных принципов ухода и использования животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakamuro D., Elliott K.J., Wechsler-Reya R., Prendergast G.C. 1996. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* **14**, 69–77.
2. Lichte B., Veh R.W., Meyer H.E., Kilimann M.W. 1992. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J.* **11**, 2521–2530.
3. Sivadon P., Bauer F., Aigle M., Crouzet M. 1995. Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast rvs161 mutant: The Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 485–495.
4. Nishimura T., Morone N., Suetsugu S. 2018. Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 379–389.
5. Itoh T., De Camilli P. 2006. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**, 897–912.
6. Frost A., Unger V.M., De Camilli P. 2009. The BAR domain superfamily: Membrane-molding macromolecules. *Cell.* **137**, 191–196.
7. Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., Vallis Y., Butler P.J., Evans P.R., McMahon H.T. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science.* **303**, 495–499.
8. Weissenhorn W. 2005. Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain. *J. Mol. Biol.* **351**, 653–661.
9. Gallop J.L., Jao C.C., Kent H.M., Butler P.J., Evans P.R., Langen R., McMahon H.T. 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* **25**, 2898–2910.
10. Itoh T., Erdmann K.S., Roux A., Habermann B., Werner H., De Camilli P. 2005. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Curr. Biol.* **9**, 791–804.
11. Frost A., De Camilli P., Unger V.M. 2007. F-BAR proteins join the BAR family fold. *Structure.* **15**, 751–753.
12. Ahmed S., Goh W.I., Bu W. 2010. I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **21**, 350–356.
13. Zhao H., Pykalainen A., Lappalainen P. 2011. I-BAR domain proteins: Linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 14–21.
14. Chatzi C., Westbrook G. L. 2021. Revisiting I-BAR proteins at central synapses. *Front. Neural Circuits.* **15**, 787436.
15. Takei K., Slepnev V.I., Haucke V., De Camilli P. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell. Biol.* **1**, 33–39.
16. Farsad K., Ringstad N., Takei K., Floyd S.R., Rose K., De Camilli P. 2001. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell. Biol.* **155**, 193–200.
17. Richnau N., Fransson A., Farsad K., Aspenstrom P. 2004. RICH-1 has a BIN/Amphiphysin/Rvsp domain responsible for binding to membrane lipids and tubulation of liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1034–1042.
18. Carman P.J., Dominguez R. 2018. BAR domain proteins—a linkage between cellular membranes, signaling pathways, and the actin cytoskeleton. *Biophys. Rev.* **10**, 1587–1604.
19. Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. 1997. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: Binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8569–8574.
20. Shupliakov O., Low P., Grabs D., Gad H., Chen H., David C., Takei K., De Camilli P., Brodin L. 1997.

- Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*. **276**, 259–263.
21. Kelley C.F., Messelaar E.M., Eskin T.L., Wang S., Song K., Vishnia K., Becalska A.N., Shupliakov O., Hagan M.F., Danino D., Sokolova O.S., Nicastro D., Rodal A.A. 2015. Membrane charge directs the outcome of F-BAR domain lipid binding and autoregulation. *Cell Rep.* **13**, 2597–2609.
 22. Kojima C., Hashimoto A., Yabuta I., Hirose M., Hashimoto S., Kanaho Y., Sumimoto H., Ikegami T., Sabe H. 2004. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413–4422.
 23. Chen Z., Chang K., Capraro B.R., Zhu C., Hsu C.J., Baumgart T. 2014. Intradimer/intermolecular interactions suggest autoinhibition mechanism in endophilin A1. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4557–4564.
 24. Rizzoli S.O., Betz W.J. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 57–69.
 25. Roos J., Kelly R.B. 1999. The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 1411–1414.
 26. Maycox P.R., Link E., Reetz A., Morris S.A., Jahn R. 1992. Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* **118**, 1379–1388.
 27. Granseth B., Odermatt B., Royle S.J., Lagnado L. 2006. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*. **51**, 773–786.
 28. Watanabe S., Liu Q., Davis M.W., Hollopeter G., Thomas N., Jorgensen N.B., Jorgensen E.M. 2013. Ultrafast endocytosis at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Elife*. **2**, e00723.
 29. Watanabe S., Rost B.R., Camacho-Perez M., Davis M.W., Sohl-Kielczynski B., Rosenmund C., Jorgensen E.M. 2013. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*. **504**, 242–247.
 30. Watanabe S., Mamer L.E., Raychaudhuri S., Luvsanjav D., Eisen J., Trimbuch T., Sohl-Kielczynski B., Fenske P., Milosevic I., Rosenmund C., Jorgensen E.M. 2018. Synaptotagmin and endophilin mediate neck formation during ultrafast endocytosis. *Neuron*. **98**, 1184–1197.e6.
 31. Shin W., Wei L., Arpino G., Ge L., Guo X., Chan C.Y., Hamid E., Shupliakov O., Bleck C.K.E., Wu L.G. 2021. Preformed omega-profile closure and kiss-and-run mediate endocytosis and diverse endocytic modes in neuroendocrine chromaffin cells. *Neuron*. **109**, 3119–3134.
 32. Wu W., Wu L. G. 2007. Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 10234–10239.
 33. Cousin M.A., Nicholls D.G. 1997. Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: Role of vesicular acidification and refilling. *J. Neurochem.* **69**, 1927–1935.
 34. Cousin M.A., Robinson P.J. 1999. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J. Neurochem.* **73**, 2227–2239.
 35. Rizzoli S. O. 2014. Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *EMBO J.* **33**, 788–822.
 36. Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. 2017. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **18**, 285–298.
 37. Shin Y., Brangwynne C.P. 2017. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. **357**
 38. McDonald N.A., Fetter R.D., Shen K. 2020. Assembly of synaptic active zones requires phase separation of scaffold molecules. *Nature*. **588**, 454–458.
 39. Milovanovic D., Wu Y., Bian X., De Camilli P. 2018. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*. **361**, 604–607.
 40. Pechstein A., Tomilin N., Fredrich K., Vorontsova O., Sopova E., Evergren E., Haucke V., Brodin L., Shupliakov O. 2020. Vesicle clustering in a living synapse depends on a synapsin region that mediates phase separation. *Cell Rep.* **30**, 2594–2602.e3.
 41. Wang S.S.H., Held R.G., Wong M.Y., Liu C., Karakhanyan A., Kaeser P.S. 2016. Fusion Competent synaptic vesicles persist upon active zone disruption and loss of vesicle docking. *Neuron*. **91**, 777–791.
 42. Wu X., Cai Q., Shen Z., Chen X., Zeng M., Du S., Zhang M. 2019. RIM and RIM-BP form presynaptic active-zone-like condensates via phase separation. *Mol. Cell*. **73**, 971–984.e5.
 43. Emperador-Melero J., Wong M.Y., Wang S.S.H., de Nola G., Nyitrai H., Kirchhausen T., Kaeser P.S. 2021. PKC-phosphorylation of Liprin-alpha3 triggers phase separation and controls presynaptic active zone structure. *Nat. Commun.* **12**, 3057.
 44. Liang M., Jin G., Xie X., Zhang W., Li K., Niu F., Yu C., Wei Z. 2021. Oligomerized liprin-alpha promotes phase separation of ELKS for compartmentalization of presynaptic active zone proteins. *Cell Rep.* **34**, 108901.
 45. Day K.J., Kago G., Wang L., Richter J.B., Hayden C.C., Lafer E.M., Stachowiak J.C. 2021. Liquid-like protein interactions catalyse assembly of endocytic vesicles. *Nat. Cell. Biol.* **23**, 366–376.
 46. Imoto Y., Raychaudhuri S., Ma Y., Fenske P., Sandoval E., Itoh K., Blumrich E.M., Matsubayashi H.T., Mamer L., Zarebidaki F., Sohl-Kielczynski B., Trimbuch T., Nayak S., Iwasa J.H., Liu J., Wu B., Ha T., Inoue T., Jorgensen E.M., Cousin M.A., Rosenmund C., Watanabe S. 2022. Dynamin is primed at endocytic sites for ultrafast endocytosis. *Neuron*. **110**, 2815–2835.e13.
 47. Wu X., Ganzella M., Zhou J., Zhu S., Jahn R., Zhang M. 2021. Vesicle tethering on the surface of phase-separated active zone condensates. *Mol. Cell*. **81**, 13–24.e7.
 48. Alberti S. 2017. Phase separation in biology. *Curr. Biol.* **27**, R1097–R1102.

49. Krabben L., Fassio A., Bhatia V.K., Pechstein A., Onofri F., Fadda M., Messa M., Rao Y., Shupliakov O., Stamou D., Benfenati F., Haucke V. 2011. Synapsin I senses membrane curvature by an amphipathic lipid packing sensor motif. *J. Neurosci.* **31**, 18149–18154.
50. Park D., Wu Y., Lee S.E., Kim G., Jeong S., Milovanovic D., De Camilli P., Chang S. 2021. Cooperative function of synaptophysin and synapsin in the generation of synaptic vesicle-like clusters in non-neuronal cells. *Nat. Commun.* **12**, 263.
51. Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N.L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Shorter J., Wolozin B., Van Den Bosch L., Tompa P., Fuxreiter M. 2018. Protein phase separation: A new phase in cell biology. *Trends Cell. Biol.* **28**, 420–435.
52. Ghosh A., Mazarakos K., Zhou H.X. 2019. Three archetypical classes of macromolecular regulators of protein liquid-liquid phase separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 19474–19483.
53. Saheki Y., De Camilli P. 2012. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005645.
54. Chanaday N.L., Cousin M.A., Milosevic I., Watanabe S., Morgan J.R. 2019. The synaptic vesicle cycle revisited: New insights into the modes and mechanisms. *J. Neurosci.* **39**, 8209–8216.
55. Di Paolo G., Sankaranarayanan S., Wenk M.R., Daniell L., Perucco E., Caldarone B.J., Flavell R., Picciotto M.R., Ryan T.A., Cremona O., De Camilli P. 2002. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron.* **33**, 789–804.
56. Slepnev V.I., Ochoa G.C., Butler M.H., De Camilli P. 2000. Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 17583–17589.
57. Cowling B.S., Prokic I., Tasfaout H., Rabai A., Humbert F., Rinaldi B., Nicot A. S., Kretz C., Friant S., Roux A., Laporte J. 2017. Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* **127**, 4477–4487.
58. Prokic I., Cowling B.S., Laporte J. 2014. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **92**, 453–463.
59. Evergren E., Marcucci M., Tomilin N., Low P., Slepnev V., Andersson F., Gad H., Brodin L., De Camilli P., Shupliakov O. 2004. Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic.* **5**, 514–528.
60. Arkhipov A., Yin Y., Schulten K. 2009. Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophys. J.* **97**, 2727–2735.
61. Loll P.J., Swain E., Chen Y., Turner B.T., Zhang J.F. 2008. Structure of the SH3 domain of rat endophilin A2. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 243–246.
62. Wigge P., McMahon H.T. 1998. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* **21**, 339–344.
63. Farsad K., Slepnev V., Ochoa G., Daniell L., Haucke V., De Camilli P. 2003. A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology.* **45**, 787–796.
64. Tomizawa K., Sunada S., Lu Y.F., Oda Y., Kinuta M., Ohshima T., Saito T., Wei F. Y., Matsushita M., Li S.T., Tsutsui K., Hisanaga S., Mikoshiba K., Takei K., Matsui H. 2003. Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell. Biol.* **163**, 813–824.
65. Micheva K.D., Ramjaun A.R., Kay B.K., McPherson P.S. 1997. SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett.* **414**, 308–312.
66. Bauerfeind R., Takei K., De Camilli P. 1997. Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J. Biol. Chem.* **272**, 30984–30992.
67. Giachino C., Lantelme E., Lanzetti L., Saccone S., Bella Valle G., Migone N. 1997. A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics.* **41**, 427–434.
68. So C.W., Sham M.H., Chew S.L., Cheung N., So C.K., Chung S.K., Caldas C., Wiedemann L.M., Chan L.C. 2000. Expression and protein-binding studies of the EEN gene family, new interacting partners for dynamin, synaptotagmin and huntingtin proteins. *Biochem. J.* **348**, Pt 2, 447–458.
69. Kjaerulff O., Brodin L., Jung A. 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem. Biophys.* **60**, 137–154.
70. Pierrat B., Simonen M., Cueto M., Mestan J., Ferrigno P., Heim J. 2001. SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain. *Genomics.* **71**, 222–234.
71. Soukup S.F., Verstreken P. 2017. EndoA/endophilin-A creates docking stations for autophagic proteins at synapses. *Autophagy.* **13**, 971–972.
72. Hernandez-Diaz S., Ghimire S., Sanchez-Miraserra I., Montecinos-Oliva C., Swerts J., Kuenen S., Verstreken P., Soukup S.F. 2022. Endophilin-B regulates autophagy during synapse development and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **163**, 105595.
73. Ambrosio M.R., Hegde B.G., Langen R. 2014. Endophilin A1 induces different membrane shapes using a conformational switch that is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 6982–6987.
74. Matta S., Van Kolen K., da Cunha R., van den Boogaart G., Mandemakers W., Miskiewicz K., De Bock P.J., Morais V.A., Vilain S., Haddad D., Delbroek L., Swerts J., Chavez-Gutierrez L., Esposito G., Daneels G., Karran E., Holt M., Gevaert K.,

- Moechars D.W., De Strooper B., Verstreken P. 2012. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron*. **75**, 1008–1021.
75. Vazquez F.X., Unger V.M., Voth G.A. 2013. Autoinhibition of endophilin in solution via interdomain interactions. *Biophys. J.* **104**, 396–403.
 76. Billuart P., Bienvenu T., Ronce N., des Portes V., Vinet M.C., Zemni R., Roest Crollius H., Carrie A., Fauchereau F., Cherry M., Briault S., Hamel B., Fryns J.P., Beldjord C., Kahn A., Moraine C., Chelly J. 1998. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*. **392**, 923–926.
 77. Khelfaoui M., Pavlowsky A., Powell A.D., Valnegri P., Cheong K.W., Blandin Y., Passafaro M., Jefferys J.G., Chelly J., Billuart P. 2009. Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2575–2583.
 78. Nakano-Kobayashi A., Kasri N.N., Newey S.E., Van Aelst L. 2009. The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1. *Curr. Biol.* **19**, 1133–1139.
 79. Govek E.E., Newey S.E., Akerman C.J., Cross J.R., Van der Veken L., Van Aelst L. 2004. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **7**, 364–372.
 80. Kessels M.M., Qualmann B. 2004. The syndapin protein family: Linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* **117**, 3077–3086.
 81. Wang Q., Navarro M.V., Peng G., Molinelli E., Goh S.L., Judson B.L., Rajashankar K.R., Sondermann H. 2009. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12700–12705.
 82. Rao Y., Ma Q., Vahedi-Faridi A., Sundborger A., Pechstein A., Puchkov D., Luo L., Shupliakov O., Saenger W., Haucke V. 2010. Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 8213–8218.
 83. Quan A., Robinson P.J. 2013. Syndapin—a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *FEBS J.* **280**, 5198–5212.
 84. Katoh M., Katoh M. 2004. Identification and characterization of human FCHO2 and mouse Fcho2 genes in silico. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 327–331.
 85. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szgyarto C. A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. **347**, 1260419.
<https://doi.org/10.1126/science.1260419>
 86. Almeida-Souza L., Frank R.A. W., Garcia-Nafria J., Colussi A., Gunawardana N., Johnson C.M., Yu M., Howard G., Andrews B., Vallis Y., McMahon H.T. 2018. A flat BAR protein promotes actin polymerization at the base of clathrin-coated pits. *Cell*. **174**, 325–337.e14.
 87. Fagerberg L., Hallstrom B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpour S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjostedt E., Lundberg E., Szgyarto C.A., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlen M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. **13**, 397–406.
 88. Reider A., Barker S.L., Mishra S.K., Im Y.J., Maldonado-Baez L., Hurley J.H., Traub L. M., Wendland B. 2009. Sypl is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J.* **28**, 3103–3116.
 89. Henne W.M., Kent H.M., Ford M.G., Hegde B.G., Daumke O., Butler P.J., Mittal R., Langen R., Evans P.R., McMahon H. T. 2007. Structure and analysis of FCHO2 F-BAR domain: A dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure*. **15**, 839–852.
 90. Brodin L., Milovanovic D., Rizzoli S.O., Shupliakov O. 2022. alpha-Synuclein in the synaptic vesicle liquid phase: Active player or passive bystander? *Front. Mol. Biosci.* **9**, 891508.
 91. Shupliakov O. 2009. The synaptic vesicle cluster: A source of endocytic proteins during neurotransmitter release. *Neuroscience*. **158**, 204–210.
 92. Bai J., Hu Z., Dittman J.S., Pym E.C., Kaplan J.M. 2010. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell*. **143**, 430–441.
 93. Denker A., Krohnert K., Buckers J., Neher E., Rizzoli S.O. 2011. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 17183–17188.
 94. Andersson F., Jakobsson J., Low P., Shupliakov O., Brodin L. 2008. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J. Neurosci.* **28**, 3925–3933.
 95. Haffner C., Takei K., Chen H., Ringstad N., Hudson A., Butler M.H., Salcini A.E., Di Fiore P.P., De Camilli P. 1997. Synaptojanin 1: Localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett.* **419**, 175–180.
 96. Evergren E., Gad H., Walther K., Sundborger A., Tomilin N., Shupliakov O. 2007. Intersectin is a nega-

- tive regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *J. Neurosci.* **27**, 379–390.
97. De Gois S., Jeanclos E., Morris M., Grewal S., Varoqui H., Erickson J.D. 2006. Identification of endophilins 1 and 3 as selective binding partners for VGLUT1 and their co-localization in neocortical glutamatergic synapses: Implications for vesicular glutamate transporter trafficking and excitatory vesicle formation. *Cell Mol. Neurobiol.* **26**, 679–693.
 98. Willet A.H., Igarashi M.G., Chen J.S., Bhattacharjee R., Ren L., Cullati S.N., Elmore Z.C., Roberts-Galbraith R.H., Johnson A.E., Beckley J.R., Gould K.L. 2021. Phosphorylation in the intrinsically disordered region of F-BAR protein Imp2 regulates its contractile ring recruitment. *J. Cell. Sci.* **134** (16), jcs258645.
 99. Su M., Zhuang Y., Miao X., Zeng Y., Gao W., Zhao W., Wu M. 2020. Comparative study of curvature sensing mediated by F-BAR and an intrinsically disordered region of FBP17. *iScience.* **23**, 101712.
 100. Mangione M.C., Snider C.E., Gould K.L. 2019. The intrinsically disordered region of the cytokinetic F-BAR protein Cdc15 performs a unique essential function in maintenance of cytokinetic ring integrity. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 2790–2801.
 101. Winther A.M., Vorontsova O., Rees K.A., Nareoja T., Sopova E., Jiao W., Shupliakov O. 2015. An endocytic scaffolding protein together with synapsin regulates synaptic vesicle clustering in the drosophila neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **35**, 14756–14770.
 102. Evergren E., Benfenati F., Shupliakov O. 2007. The synapsin cycle: A view from the synaptic endocytic zone. *J. Neurosci. Res.* **85**, 2648–2656.
 103. Weston M.C., Nehring R.B., Wojcik S.M., Rosenmund C. 2011. Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron.* **69**, 1147–1159.
 104. Pechstein A., Gerth F., Milosevic I., Japel M., Eichhorn-Grunig M., Vorontsova O., Bacetic J., Maritzen T., Shupliakov O., Freund C., Haucke V. 2015. Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO Rep.* **16**, 232–239.
 105. Gowrisankaran S., Houy S., Del Castillo J.G.P., Steubler V., Gelker M., Kroll J., Pinheiro P.S., Schwitters D., Halbsgut N., Pechstein A., van Weering J.R.T., Maritzen T., Haucke V., Raimundo N., Sorensen J.B., Milosevic I. 2020. Endophilin-A coordinates priming and fusion of neurosecretory vesicles via intersectin. *Nat. Commun.* **11**, 1266.
 106. Somasundaram A., Taraska J.W. 2018. Local protein dynamics during microvesicle exocytosis in neuroendocrine cells. *Mol. Biol. Cell.* **29**, 1891–1903.
 107. Khelfaoui M., Denis C., van Galen E., de Bock F., Schmitt A., Houbon C., Morice E., Giros B., Ramakers G., Fagni L., Chelly J., Nosten-Bertrand M., Billuart P. 2007. Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J. Neurosci.* **27**, 9439–9450.
 108. Houy S., Estay-Ahumada C., Croise P., Calco V., Haeberle A.M., Bailly Y., Billuart P., Vitale N., Bader M.F., Ory S., Gasman S. 2015. Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* **35**, 11045–11055.
 109. Del Signore S.J., Kelley C.F., Messelaar E.M., Lemos T., Marchan M.F., Ermanoska B., Mund M., Fai T.G., Kaksonen M., Rodal A.A. 2021. An autoinhibitory clamp of actin assembly constrains and directs synaptic endocytosis. *Elife.* **10**, e69597.
 110. Henne W.M., Boucrot E., Meinecke M., Evergren E., Vallis Y., Mittal R., McMahon H.T. 2010. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science.* **328**, 1281–1284.
 111. El Alaoui F., Casuso I., Sanchez-Fuentes D., Arpin-Andre C., Rathar R., Baecker V., Castro A., Lorca T., Viaud J., Vassilopoulos S., Carretero-Genevriar A., Picas L. 2022. Structural organization and dynamics of FCHo2 docking on membranes. *Elife.* **11**, e73156.
 112. Zaccai N.R., Kadlecova Z., Dickson V.K., Korobchevskaya K., Kamenicky J., Kovtun O., Uma-sankar P.K., Wrobel A.G., Kaufman J.G.G., Gray S.R., Qu K., Evans P.R., Fritzsche M., Sroubek F., Honing S., Briggs J.A.G., Kelly B.T., Owen D.J., Traub L.M. 2022. FCHO controls AP2's initiating role in endocytosis through a PtdIns(4,5)P2-dependent switch. *Sci. Adv.* **8**, eabn2018.
 113. Sundborger A., Soderblom C., Vorontsova O., Evergren E., Hinshaw J.E., Shupliakov O. 2011. An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Sci.* **124**, 133–143.
 114. Ringstad N., Gad H., Low P., Di Paolo G., Brodin L., Shupliakov O., De Camilli P. 1999. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron.* **24**, 143–154.
 115. Gad H., Ringstad N., Low P., Kjaerulff O., Gustafsson J., Wenk M., Di Paolo G., Nemoto Y., Crun J., Ellisman M.H., De Camilli P., Shupliakov O., Brodin L. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron.* **27**, 301–312.
 116. Milosevic I., Giovedi S., Lou X., Raimondi A., Collesi C., Shen H., Paradise S., O'Toole E., Ferguson S., Cremona O., De Camilli P. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron.* **72**, 587–601.
 117. Antonny B., Burd C., De Camilli P., Chen E., Daumke O., Faelber K., Ford M., Frolov V.A., Frost A., Hinshaw J.E., Kirchhausen T., Kozlov M.M., Lenz M., Low H.H., McMahon H., Merrifield C., Pollard T.D., Robinson P.J., Roux A., Schmid S. 2016. Membrane

- fission by dynamin: What we know and what we need to know. *EMBO J.* **35**, 2270–2284.
118. Cao M., Wu Y., Ashrafi G., McCartney A.J., Wheeler H., Bushong E.A., Boassa D., Ellisman M.H., Ryan T.A., De Camilli P. 2017. Parkinson sac domain mutation in synaptojanin 1 impairs clathrin uncoating at synapses and triggers dystrophic changes in dopaminergic axons. *Neuron*. **93**, 882–896.e5.
 119. Massol R.H., Boll W., Griffin A.M., Kirchhausen T. 2006. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 10265–10270.
 120. Shupliakov O., Akkuratova N., Korenkova O., Onochin K., Sopova E., Winther Å.M.E. 2020. Targeting of an F-BAR domain protein to the synaptic periaxial zone ensures a uniform size of synaptic vesicles. *Eur. Neuropsychopharm.* **40**, 440–441.
 121. Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debar S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnet N., McMahon H.T. 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*. **517**, 460–465.
 122. Renard H.F., Simunovic M., Lemiere J., Boucrot E., Garcia-Castillo M.D., Arumugam S., Chambon V., Lamaze C., Wunder C., Kenworthy A.K., Schmidt A.A., McMahon H.T., Sykes C., Bassereau P., Johannes L. 2015. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*. **517**, 493–496.
 123. Ferreira A.P.A., Casamento A., Roas S.C., Panambalana J., Subramaniam S., Schützenhofer K., Halff E.F., Wah Hak L.C., McGourty K., Kittler J.T., Thalassinou K., Martinvalet D., Boucrot E. 2021. Cdk5 and GSK3 β inhibit fast endophilin-mediated endocytosis. *Nat. Commun.* **12**, 2424.
 124. Casamento A., Boucrot E. 2020. Molecular mechanism of fast endophilin-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **477**, 2327–2345.
 125. Clayton E.L., Anggono V., Smillie K.J., Chau N., Robinson P.J., Cousin M.A. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* **29**, 7706–7717.
 126. Cheung G., Cousin M.A. 2019. Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires a dephosphorylation-dependent dynamin-syndapin interaction. *J. Neurochem.* **151**, 570–583.
 127. Modregger J., Schmidt A.A., Ritter B., Huttner W.B., Plomann M. 2003. Characterization of endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1. *J. Biol. Chem.* **278**, 4160–4167.
 128. Qualmann B., Roos J., DiGregorio P.J., Kelly R.B. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 501–513.
 129. Onofri F., Giovedi S., Kao H.T., Valtorta F., Bongiorno Borbone L., De Camilli P., Benfenati F. 2000. Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 29857–29867.
 130. Schneider K., Seemann E., Liebmann L., Ahuja R., Koch D., Westermann M., Hubner C.A., Kessels M.M., Qualmann B. 2014. ProSAP1 and membrane nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function. *J. Cell. Biol.* **205**, 197–215.
 131. Gerth F., Japel M., Pechstein A., Kochlamazashvili G., Lehmann M., Puchkov D., Onofri F., Benfenati F., Nikonenko A. G., Fredrich K., Shupliakov O., Maritzen T., Freund C., Haucke V. 2017. Intersectin associates with synapsin and regulates its nanoscale localization and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 12057–12062.
 132. Takahashi Y., Meyerkord C.L., Wang H.G. 2009. Bif-1/endophilin B1: A candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 947–955.
 133. Karbowski M., Jeong S.Y., Youle R.J. 2004. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell. Biol.* **166**, 1027–1039.
 134. Yang Y., Chen J., Guo Z., Deng S., Du X., Zhu S., Ye C., Shi Y.S., Liu J.J. 2018. Endophilin A1 promotes actin polymerization in dendritic spines required for synaptic potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 177.
 135. Meunier B., Quaranta M., Daviet L., Hatzoglou A., Leprince C. 2009. The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur. J. Cell. Biol.* **88**, 91–102.
 136. Chapuis J., Hansmann F., Gistelink M., Mounier A., Van Cauwenberghe C., Kolen K. V., Geller F., Sottejeau Y., Harold D., Dourlen P., Grenier-Boley B., Kamatani Y., Delepine B., Demiautte F., Zelenika D., Zommer N., Hamdane M., Bellenguez C., Dartigues J.F., Hauw J.J., Letronne F., Ayrat A.M., Sleegers K., Schellens A., Broeck L.V., Engelborghs S., De Deyn P.P., Vandenberghe R., O'Donovan M., Owen M., Epelbaum J., Mercken M., Karran E., Bantscheff M., Drewes G., Joberty G., Campion D., Octave J.N., Berr C., Lathrop M., Callaerts P., Mann D., Williams J., Buee L., Dewachter I., Van Broeckhoven C., Amouyel P., Moechars D., Deraut B., Lambert J.C., GERAD consortium. 2013. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry*. **18**, 1225–1234.
 137. Noda N.N., Wang Z., Zhang H. 2020. Liquid-liquid phase separation in autophagy. *J. Cell. Biol.* **219**, e202004062.
 138. Fujioka Y., Alam J.M., Noshiro D., Mouri K., Ando T., Okada Y., May A.I., Knorr R.L., Suzuki K., Ohsumi Y., Noda N.N. 2020. Phase separation organizes the site of autophagosome formation. *Nature*. **578**, 301–305.
 139. La Cunza N., Tan L.X., Thamban T., Germer C.J., Rathnasamy G., Toops K.A., Lakkaraju A. 2021. Mitochondria-dependent phase separation of disease-relevant proteins drives pathological features of age-related macular degeneration. *JCI Insight*. **6**, e142254.

BAR Domain Proteins As Putative Regulators of the Protein Liquid Phase in Nerve Terminals in the Central Nervous System

A. G. Shishkov¹, N. V. Nifantova¹, O. M. Korenkova¹, E. S. Sopova^{1, 2}, L. Brodin², O. Shupliakov^{1, 2, *}

¹*Institute of Translational Biomedicine, St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, 17177 Sweden*

**e-mail: oleg.shupliakov@ki.se*

BAR proteins are key components of the synaptic vesicle cycle in nerve terminals. They participate in the regulation of neurotransmitter release during the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and synaptic vesicle recycling. Localization of these proteins at sites of liquid–liquid phase separation in nerve terminals suggests additional functions of these molecules. In the current review, we discuss the tasks of BAR proteins at different stages of the secretory cycle, including their putative role in liquid–liquid phase transitions in nerve terminals during synaptic activity. We suggest that BAR proteins, along with their established functions in exo- and endocytosis, play crucial roles in the organization of the reserve pool of synaptic vesicles and at the intermediate stages of the vesicle cycle.

Keywords: synapse, synaptic vesicle cycle, exocytosis, endocytosis, BAR proteins, liquid–liquid phase transition

УДК 577.355.3

ВЛИЯНИЕ АККЛИМАЦИИ РАСТЕНИЙ НА ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ В МЕМБРАНАХ ХЛОРОПЛАСТОВ *Cucumis sativus* И *Cucumis melo*

© 2023 г. М. А. Беньков^а, И. С. Сусличенко^а, Б. В. Трубицин^а, А. Н. Тихонов^а, *

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 01.12.2022 г.

Принята к публикации 03.12.2022 г.

В работе исследованы процессы электронного транспорта в листьях двух видов растений рода *Cucumis*, теневыносливого вида *Cucumis sativus* (огурец) и светолюбивого вида *Cucumis melo* (дыня), выращенных в условиях умеренной (50–125 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) или сильной освещенности (850–1000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). В качестве показателей, характеризующих активность фотосистемы 2 (ФС2), использовали параметры быстрой и медленной индукции флуоресценции хлорофилла *a*. За функционированием фотосистемы 1 (ФС1) следили по изменениям сигнала электронного парамагнитного резонанса от окисленных реакционных центров ФС1, P_{700}^{+} . Выявлено существенное различие в динамике изменений фотосинтетических показателей теневыносливых (*C. sativus*) и светолюбивых (*C. melo*) видов при их акклимации к умеренной и сильной интенсивности света. У теневыносливого вида *C. sativus* фотосинтетические показатели, характеризующие активность ФС2, обнаруживают заметную чувствительность к усилению освещения по сравнению со светолюбивым видом *C. melo*, свидетельствуя об ослаблении активности ФС2 при повышении интенсивности света при акклимации растений. В ходе длительной (более 1–2 месяцев) акклимации *C. sativus* к свету высокой интенсивности (≥ 500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) их ФС2 теряет фотохимическую активность, чего, однако, не наблюдалось для листьев *C. melo*. Ослабление активности ФС2 в листьях *C. sativus* было обратимым — после возвращения к свету умеренной интенсивности активность ФС2 восстанавливалась до уровня, характерного для листьев *C. melo*. В листьях растений обоих видов проявляются различия в кинетике фотоиндуцированных редокс-превращений реакционных центров ФС1 в зависимости от условий акклимации. У растений, акклимированных к сильному свету, наблюдается четко выраженная замедленная фаза роста сигнала от P_{700}^{+} , которая предположительно может быть обусловлена циклическим электронным транспортом (ЦЭТ) вокруг ФС1. Отношение амплитуд сигналов ЭПР от P_{700}^{+} при действии белого и дальнего красного света (707 нм) становится выше у растений, выращенных на сильном свете. Это может быть связано с увеличением ЦЭТ, способствующего оптимизации энергетического баланса и ослаблению светового стресса при избытке освещения. Полученные результаты обсуждаются в контексте задачи об оптимизации фотосинтетических процессов при акклимации растений.

Ключевые слова: растения рода *Cucumis*, акклимация, индукция флуоресценции хлорофилла, ЭПР

DOI: 10.31857/S0233475523030039, EDN: EVMIOV

ВВЕДЕНИЕ

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) фотосинтезирующих организмов окислительного типа содержит пигмент-белковые комплексы двух типов:

Сокращения: БИФ — быстрая индукция флуоресценции; БС — белый свет; ДКС — дальний красный свет; МИФ — медленная индукция флуоресценции; НФТ — нефотохимическое тушение; P_{700} — первичный донор электрона в фотосистеме 1; СС и УС — сильный и умеренный свет соответственно; ФСА — фотосинтетический аппарат; ФС1 и ФС2 — фотосистема 1 и фотосистема 2 соответственно; ЦКБ — цикл Кальвина–Бенсона; ЦЭТ — циклический электронный транспорт; Хл — хлорофилл; ЭПР — электронный парамагнитный резонанс; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; PQ — пластохинон.

фотосистему 1 (ФС1) и фотосистему 2 (ФС2), которые за счет энергии света обеспечивают перенос электронов от воды, разлагаемой в ФС2, к NADP^{+} — конечному акцептору электронов в ФС1. Перенос электронов от ФС2 к ФС1 происходит с участием цитохромного *b₆f*-комплекса и подвижных электронных переносчиков — пластохинона (PQ) и пластоцианина [1–5]. При функционировании ЭТЦ создается транс-тилакоидная разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^{+}}$), являющаяся источником энергии для работы АТФ-синтазы [6, 7]. Макроэргические продукты световых стадий фотосин-

теза (АТФ и NADPH) используются для фиксации CO_2 и синтеза углеводов в реакциях цикла Кальвина—Бенсона (ЦКБ) [8].

Продуктивность фотосинтеза зависит от условий произрастания растений. В природных условиях интенсивность и спектральный состав света изменяются в течение суток. Недостаток освещения ограничивает фотосинтез; избыток света может вызывать фотодеструктивные процессы, нарушающие работу фотосинтетического аппарата (ФСА) [9]. Существуют механизмы, оптимизирующие работу ФСА при изменении условий произрастания растений (освещение [10], температура [11–13]). Обычно выделяют быстрые (секунды—минуты) и долгосрочные (часы—сутки) механизмы регуляции фотосинтеза. Быстрые механизмы реализуются за счет (1) активации/деактивации реакций ЦКБ [14, 15], (2) pH-зависимой регуляции скорости электронного переноса по ЭТЦ [16–19], (3) перераспределения энергии света между ФС1 и ФС2 [20] и (4) структурно-функциональных перестроек ФСА [21–24]. Долгосрочные механизмы оптимизации фотосинтеза связаны с синтезом или деградацией тех или иных компонентов ФСА, которые влияют на “архитектуру” и функциональные свойства хлоропластов.

В контексте задачи о механизмах акклимации¹ растений к изменяющимся условиям среды особый интерес представляет сравнительное изучение близкородственных видов растений, принадлежащих к “контрастным” экотипам. Это могут быть, например, растения одного рода, но адаптированные к произрастанию в теневых условиях или при интенсивном освещении. Ранее, в работах [25–30], нами были изучены фотосинтетические показатели двух контрастных видов традесканции (*Tradescantia*) — теневыносливого вида *T. fluminensis* (эндемичный вид, произрастающий во влажных тропических лесах юго-востока Бразилии) и светолюбивого вида *T. sillamontana*, исторической родиной которого являются полупустынные районы Мексики и Перу [31]. Другой пример — изучение ФСА двух видов растений рода *Cucumis*, произрастающих в районах с теплым и умеренным климатом. К таким растениям относятся *C. melo* (дыня) и *C. sativus* (огурец), имеющие общих предков (род *Cucumis*). В работах [32, 33] с помощью липидорастворимых спиновых зондов было показано, что термоиндуцированные структурные переходы в тилакоидных мембранах,

которые влияют на их функциональные свойства, в хлоропластах дыни происходят при более высоких температурах (~35°C), чем в хлоропластах огурца (~20–25°C). Это наблюдение согласуется с тем, что ФСА дыни обычно функционирует при температурах, характерных для теплого климата в районах культивирования этого вида².

В настоящей работе описаны результаты исследования электрон-транспортных процессов у двух видов растений рода *Cucumis* (*C. melo* и *C. sativus*), акклимированных к высокой или к умеренной интенсивности света. ФС2 — наиболее уязвимый белковый комплекс хлоропластов, который повреждается при световом стрессе и при повышении температуры [12, 34, 35]. В качестве показателей, отражающих фотохимическую активность ФС2 [36–39], мы измеряли параметры кривых быстрой и медленной индукции флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*) в ФСА листьев *in situ*. В дополнение к этому мы изучали функционирование ФС1, регистрируя редокс-превращения реакционных центров P_{700} (первичный донор электрона в ФС1) методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Показано, что кинетика фотоокисления P_{700} в листьях растений обоих видов имеет двухфазный характер. При этом у растений, акклимированных к сильному свету, наблюдается четко выраженная замедленная фаза роста сигнала от P_{700}^+ , которая может быть обусловлена циклическим электронным транспортом (ЦЭТ) вокруг ФС1 на начальных стадиях освещения листьев, адаптированных к темноте. Показано также, что в ходе длительной акклимации (более 1–2 месяцев) к свету высокой интенсивности (≥ 500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) ФСА листьев *C. sativus* теряет активность ФС2, что, однако, не характерно для световыносливого вида *C. melo*. Ослабление активности ФС2 обратимо — после возвращения к свету умеренной интенсивности активность ФС2 восстанавливается до уровня, характерного для растений вида *C. melo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения. Растения рода *Cucumis* выращивали в лабораторных условиях из коммерчески доступных семян огурца (сорта “дальневосточный”, “изящный”, “конкурент”, “обильный”) и дыни (сорта “алтайская”, “колхозница”, “таманская”). Растения культивировали в почвенной культуре при комнатной температуре (24–26°C) и относительной влажности 40–60%. Горшки с проростками растений (рис. 1) помещали в темную камеру, внутри которой были два освещаемых отсека,

¹ Термин “акклимация” относится к приспособлению растений к условиям их произрастания (освещение, температура, влажность, режим питания и т.д.). “Адаптацией” называют процессы, связанные с видообразованием в ходе биологической эволюции. Мы используем выражение “адаптация образца к темноте”, подразумевая, что после кратковременного (1–2 мин) предварительного освещения, выполнявшегося для стандартизации условий эксперимента, образец листа находился определенное время в темноте.

² В сельскохозяйственной культуре дыня известна более 4 тысяч лет: возделывалась в Древнем Египте, Китае, Персии, Средняя Азия.

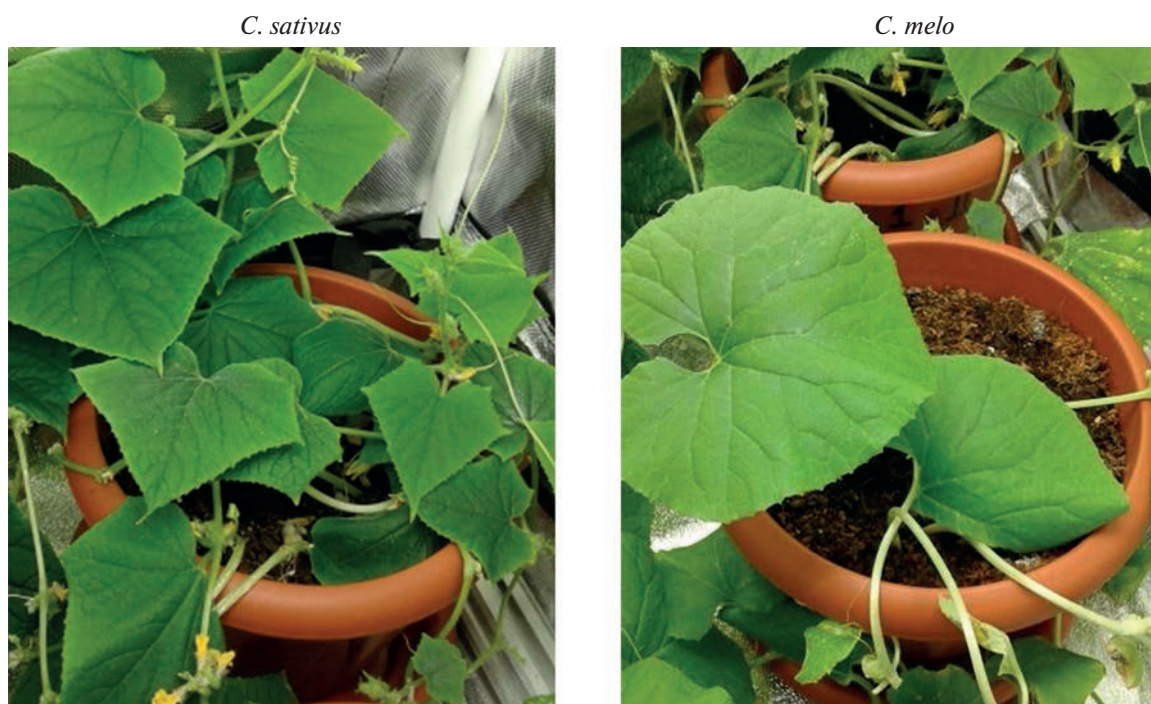


Рис. 1. Проростки растений рода *Cucumis* (*C. sativus* и *C. melo*), использованные в опытах по акклимации растений.

различающиеся по интенсивности света. Источником света служила светодиодная лампа УСС 90 магистраль Ш (ООО “ТД ФОКУС”, Россия), укомплектованная светодиодами с цветовой температурой 5000 К (Nichia, Япония). Этот свет содержит компоненты фотосинтетически активного света, включая синий, красный и дальний красный свет, необходимые для нормального роста и развития растений. Интенсивность освещения измеряли с помощью квантометра Li250A (LiCOR Biosciences, США). Осветительное устройство включали и выключали с помощью программируемого устройства. Длительность светового периода составляла 12 ч. Потоки света составляли 850–1000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (сильный свет, СС) или 50–125 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (умеренный свет, УС). Для измерений использовали второй или третий зрелый лист, расположенный в верхней части побега. При измерениях характеристик листа методами флуоресцентного анализа и ЭПР образец освещали с абдоминальной стороны листа. Перед началом измерений образцы адаптировали к темноте в течение 10 мин.

Измерения флуоресценции. Флуоресценцию хлорофилла (Хл) регистрировали с помощью РАМ-флуориметра модели FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Чешская республика), как было описано ранее [25–30]. Спектры непрерывного действующего (“актиничного”) света и измерительного импульсного света имели максимум при 475 нм и полуширину $\Delta\lambda_{1/2} = 25$ нм. Перед нача-

лом измерений лист предварительно освещали актиничным светом в течение 1 мин (для стандартизации условий опыта), а затем выдерживали в темноте в течение 10 мин. Параметры кривых индукции флуоресценции Хл *a* определяли согласно стандартным протоколам, описанным в работах [36–39].

Характерные кривые быстрой индукции флуоресценции (БИФ) Хл *a* листьев *C. sativus* и *C. melo*, акклимированных к сильному или умеренному свету, представлены на рис. 2. Эти кривые показывают, как изменяется интенсивность флуоресценции во время действия вспышки света длительностью 2 с (световой поток 3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Все кривые БИФ имеют характерные особенности (перегибы и локальные экстремумы), обозначенные символами О, J, I и Р. Параметр F_0 — начальный уровень флуоресценции Хл *a* листьев, адаптированных к темноте. F_m — максимальный уровень флуоресценции, измеренной в ответ на действие насыщающего импульса света в листе, адаптированном к темноте (10 мин). Отношение $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (параметр вариабельной флуоресценции) служит мерой максимальной фотохимической активности ФС2 (относительным квантовым выходом) в листьях, адаптированных к темноте [37–39].

Для регистрации кинетики медленной индукции флуоресценции (МИФ) включали непрерывный свет ($\lambda_{\text{макс}} = 475$ нм), называемый актиничным (действующим) светом (actinic light). Интенсив-

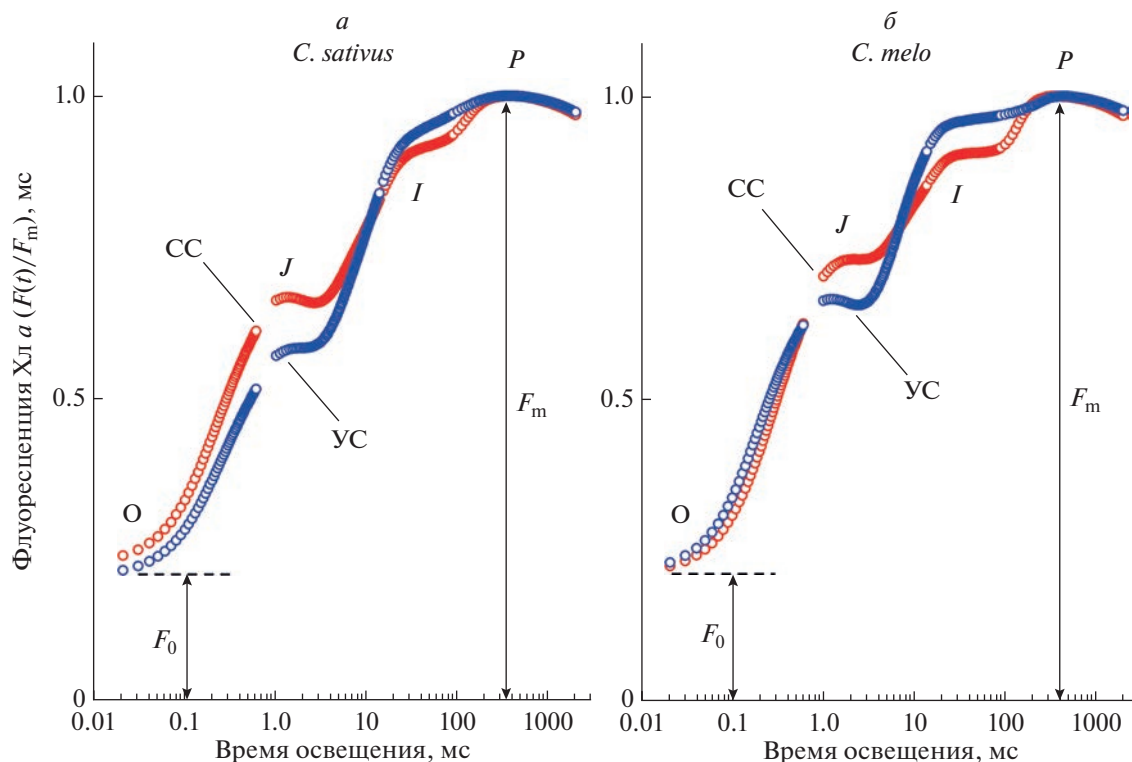


Рис. 2. Типичные кинетические кривые быстрой индукции флуоресценции листьев растений *C. sativus* (а) и *C. melo* (б).

ность актиничного света составляла $800 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, его продолжительность могли варьировать пределах от 2.5 до 7 мин. На фоне актиничного света периодически включали короткие вспышки насыщающего импульсного света. Для измерения динамики светоиндуцированных изменений коэффициента нефотохимического тушения (НФТ) флуоресценции использовали специальный протокол LC3, предусмотренный в настройках прибора FluorPen FP100. Согласно этому протоколу, образец освещали импульсами действующего (actinic) света длительностью, равной 1 мин, следующими с возрастающей интенсивностью: 10, 20, 50, 100, 300, 500 и 1000 $\text{мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ соответственно (см. подробнее рис. 5).

Электронный парамагнитный резонанс. Наблюдая за изменениями сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ , мы следили за функционированием ФС1 в хлоропластах *in situ* (высечки из листьев) [40, 41]. Образец (кусочек листа размерами $4 \times 25 \text{ мм}$) закрепляли в хорошо вентилируемом пластиковом держателе и помещали в резонатор спектрометра ЭПР модели E-4 (Varian, США). Микроволновая мощность составляла 10 мВт, амплитуда ВЧ-модуляции была равна 0.4 мТ. Образцы освещали белым светом (БС, 320 Вт м^{-2}) или сравнительно слабым красным светом (КС, $\lambda_{\text{макс}} =$

650 нм , $\Delta\lambda_{1/2} = 8 \text{ нм}$, интенсивность $\approx 8 \text{ Вт м}^{-2}$), возбуждающим обе фотосистемы, или сравнительно слабым дальним красным светом (ДКС, $\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$, $\Delta\lambda_{1/2} = 5 \text{ нм}$, 8 Вт м^{-2}), возбуждающим преимущественно ФС1. В качестве светофильтров, с помощью которых выделяли КС и ДКС из белого света, использовали интерференционные фильтры фирмы Karl Zeiss Jena (Германия). За кинетикой редокс-превращений P_{700} следили по величине низкополевого экстремума первой производной сигнала ЭПР от P_{700}^+ . Особенности регистрации сигналов ЭПР в листьях растений подробно описаны в работе [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция флуоресценции хлорофилла а

Быстрая индукция флуоресценции (БИФ). Приведенные на рис. 2 кривые БИФ были получены на листьях *C. sativus* (рис. 2а) и *C. melo* (рис. 2б), произрастающих сравнительно небольшое время (около месяца) в условиях сильного или умеренного освещения. Все кинетические кривые нормированы на максимальную величину сигнала F_m . Эти кривые имеют общие закономерности: в ответ на насыщающую вспышку света ($\lambda_{\text{макс}} = 475 \text{ нм}$), подаваемую на лист, адаптированный к темноте, флуоресценция Хл а быстро достигает начального

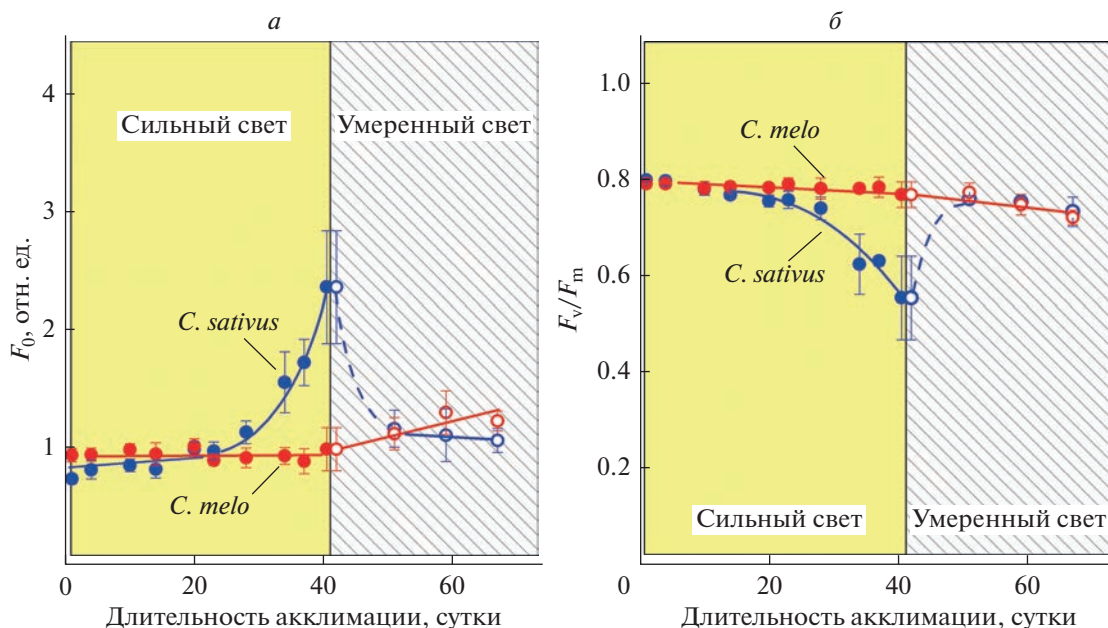


Рис. 3. Влияние длительности акклимации к свету сильной и умеренной интенсивности на значения параметров F_0 и F_v/F_m в листьях исследуемых растений. Приведены средние значения ($n = 6-8$) $\pm$ стандартные отклонения.

уровня F_0 , а затем растет до максимального уровня Р, характеризуемого параметром F_m , проходя через точки перегиба, отмеченные символами J и I. После достижения максимального уровня Р (за время ≈ 1 с) наблюдается небольшой спад флуоресценции. Согласно [36, 39, 42, 43], стадия роста О–J отражает восстановление первичного пластохинона PQ_A , прочно связанного с ФС2. Следующая стадия роста флуоресценции (участок J–I–Р), называемая тепловой фазой [42, 43], отражает восстановление вторичного пластохинона PQ_B ($PQ_A \rightarrow PQ_B$) и дальнейший перенос электронов в ЦЭТ между ФС2 и ФС1. Определенный вклад в тепловую фазу может вносить перераспределение поглощенной энергии между ФС2 и ФС1 (явление, получившее название state transitions) [44]. Сравнивая кривые БИФ в листьях *C. sativus* и *C. melo* для растений, акклимированных к сильному или умеренному свету, можно заметить общую закономерность: в листьях обоих видов растений, акклимированных к сильному свету, экстремум J был несколько выше, чем у растений, произрастающих при умеренном освещении. В случае экстремума I наблюдалась обратная ситуация.

Как показали наши исследования, параметры начальной (F_0) и варибельной ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) флуоресценции могут изменяться в ходе акклимации растений, что было особенно заметно в случае теневыносливого вида *C. sativus*. На рис. 3 показаны зависимости параметров F_0 (рис. 3а) и F_v/F_m (рис. 3б) от длительности аккли-

мации растений. Нами были проведены наблюдения за этими показателями для листьев *in vivo* (без отрыва листьев от стебля) при акклимации растений (более 2 месяцев), начиная с молодого возраста растений, когда уже сформировались листовые пластинки. Сначала в течение 40 суток растения росли на сильном свету ($850-1000$ мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$), затем их помещали в камеру с умеренным светом ($50-125$ фотонов $m^{-2} s^{-1}$) того же спектрального состава. Из рис. 3а видно, что у растений теневыносливого вида (*C. sativus*) параметр F_0 в течение первых 24 суток роста на сильном свету практически не изменялся, но затем начал увеличиваться. Заметный рост F_0 , наблюдавшийся для листьев растений *C. sativus*, акклимируемых к сильному освещению, был обратимым. После ослабления света на 42-е сутки параметр F_0 вернулся к исходному уровню. Обратимые изменения параметра F_0 в листьях *C. sativus* могут отражать процессы структурно-функциональной реорганизации их ФСА в ходе акклимации растений к свету высокой интенсивности. При выращивании растений светолюбивого вида (*C. melo*) заметных изменений параметра F_0 не наблюдали. Небольшие изменения F_0 после акклимации растений на умеренном свету не являются статистически значимыми. Это означает, что акклимация световыносливого растения *C. melo* к сильному свету не приводит к заметным изменениям ФСА.

Межвидовое различие в динамике изменений F_0 характерно также для варибельной флуоресценции, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Из рис. 3б видно,

что в листьях светолюбивого вида *C. melo* отношение F_v/F_m оставалось приблизительно на одном и том же уровне для растений, культивируемых при двух интенсивностях света. Однако в листьях теневыносливого вида *C. sativus* отношение F_v/F_m начинает заметно уменьшаться после 24 дней акклимации к сильному свету. Падение отношения F_v/F_m отражает уменьшение фотохимической активности ФС2. Этот эффект обратим: после ослабления интенсивности света отношение F_v/F_m возвращается к исходному значению $F_v/F_m \approx 0.78$, характерному для растений, произрастающих при умеренных интенсивностях света (рис. 3б). Обратимость эффекта ослабления F_v/F_m на сильном свету может свидетельствовать о функциональной гибкости ФСА листьев вида *C. sativus* — фотохимическая активность ФС2 хлоропластов сравнительно быстро (в течение нескольких суток) восстанавливается после ослабления освещенности.

Медленная индукция флуоресценции (МИФ). Описанные выше межвидовые различия в зависимостях параметров F_0 и F_v/F_m от длительности акклимации (рис. 3) наглядно проявляются также при измерениях МИФ (рис. 4). Немонотонная кинетика МИФ описывает изменения флуоресценции Хл *a* в листьях растений, адаптированных к темноте. В ответ на включение достаточно продолжительного актиничного света (десятки секунд — минуты) сначала наблюдается сравнительно быстрый рост флуоресценции (стадия О—Р), а затем обычно наступает ее спад к стационарному (квазистационарному) уровню Т (эффект Каутского [36–39, 42, 43]). Спад флуоресценции может отражать разные процессы: светозависимую активацию ферментов ЦКБ [14, 15], усиление НФТ [45–48], перераспределение электронных потоков (нециклический/циклический транспорт электронов в хлоропластах [49]), рН-зависимую регуляцию электронного транспорта [16–19], перемещение хлоропластов внутри растительной клетки и другие процессы [23]. Кинетика спада флуоресценции, как известно, может варьировать в зависимости от объекта и условий эксперимента [42, 43]. К числу факторов, влияющих на форму кривой МИФ, относятся интенсивность и спектральный состав света, а также длительность акклимации растений.

На рис. 4 приведены типичные кривые МИФ для листьев растений *C. sativus* и *C. melo*, акклимированных к сильному или к умеренному свету в течение 5 недель. Во всех опытах наблюдалось монотонное уменьшение флуоресценции Хл *a* при действии непрерывного актиничного света. Интенсивность актиничного света составляла 800 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что сравнимо с интенсивностью сильного света, использовавшегося при акклимации растений. В случае листьев *C. sativus* спад кривой МИФ у растений, акклими-

рованных к сильному свету, был более быстрым, чем у растений, акклимированных к умеренному свету (рис. 4а). Аналогичный эффект наблюдался для листьев *C. melo* (рис. 4б), но эффект ускорения спада флуоресценции у растений, акклимированных к сильному свету, был выражен слабее, чем в листьях *C. sativus*. После выключения актиничного света интенсивность флуоресценции, измеряемой при действии слабых зондирующих импульсов, возвращалась к исходному уровню F_0 . На рис. 4 вертикальными стрелками показаны моменты включения насыщающих коротких вспышек света, подаваемых в темноте. Видно, что в ответ на первую вспышку, действующую на адаптированный к темноте (10 мин) лист до включения актиничного света, происходит значительный всплеск флуоресценции (F_m), сменяемый ее спадом к исходному уровню (F_0). После выключения актиничного света в ответ на насыщающие вспышки также наблюдается всплеск флуоресценции (F'_m). Однако в этом случае интенсивность флуоресценции меньше ответа на первую вспышку света, подаваемую после достаточно длительной (10-мин) адаптации образца к темноте ($F'_m < F_m$). Это обусловлено эффектом НФТ флуоресценции, создаваемым в результате действия актиничного света. По мере адаптации образца к темноте после выключения актиничного света ответ на насыщающие вспышки света, отмеченные на рис. 4 стрелками, возрастает. Это связано с ослаблением НФТ в темноте. Заметим, что в листьях растений, акклимированных к сильному свету, ослабление НФТ в темноте, проявляющееся как увеличение параметра F'_m , происходит быстрее, чем в листьях, акклимированных к умеренному свету.

Нефотохимическое тушение флуоресценции (НФТ). На рис. 5 и 6 представлены результаты опытов, на основании которых были определены коэффициенты НФТ в листьях *C. sativus* и *C. melo*, измеренные при различных интенсивностях актиничного света. Протокол измерений предусматривает, что адаптированный к темноте (10 мин) образец освещается в течение 7 мин серией импульсов актиничного света ($\lambda_{\text{макс}} = 475 \text{ нм}$) длительностью 1 мин; при этом интенсивность актиничного света последовательно возрастает вплоть до 1000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, как это указано на рис. 5. Видно, что по мере увеличения интенсивности актиничного света выход флуоресценции (параметр F'_m) в ответ на короткие интенсивные вспышки света (3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) уменьшался. Уменьшение F'_m , как известно, обычно связывают с усилением НФТ флуоресценции Хл *a*. При использовании протокола измерений флуоресценции в опытах, результаты которых по-

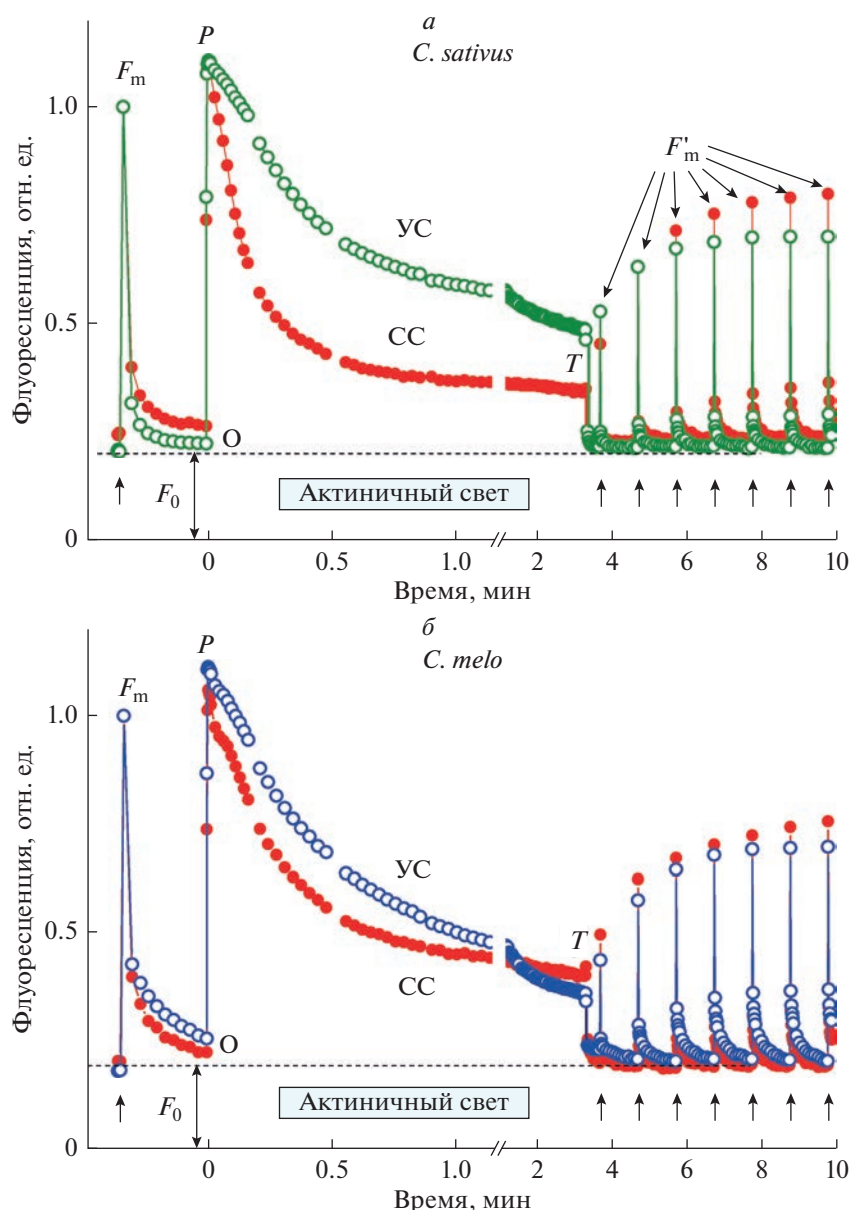


Рис. 4. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции Хл *a* во время действия непрерывного актиничного света ($\lambda_{\text{макс}} = 475$ нм, $800 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в листьях растений *C. sativus* (а) и *C. melo* (б), акклимизированных в течение 5 недель к сильному (СС) или умеренному (УС) свету. Перед началом измерений флуоресценции листья были адаптированы к темноте в течение 10 мин. Стрелками показаны моменты включения коротких (1 с) насыщающих вспышек света.

казаны на рис. 5, мы вычисляли коэффициент НФТ, равный $(F_m - F'_m)/F_m$. Этот параметр может быть отнесен к быстрой (~ 1 мин) компоненте НФТ, обычно называемой энергетической компонентой q_E , которая обусловлена генерацией транс-тилакоидной разности рН (ΔpH) [45–48].

Из приведенных на рис. 6 данных следует, что в акклимизированных к сильному свету листьях теневыносливого вида *C. sativus* значение параметра q_E было заметно больше, чем в случае рас-

тений этого же вида, акклимизированных к умеренному свету. Это означает, что в ходе акклимации к сильному свету у ФСА листьев *C. sativus* усиливается способность противостоять окислительному стрессу при избытке света; это происходит за счет усиления НФТ, ослабляющего фотохимическую активность ФС2. Способность ФСА к усилению НФТ, как известно, коррелирует с увеличением экспрессии регуляторного белка PsbS при акклимации растений к сильному свету [23, 27, 34, 45, 46]. В случае листьев светолюбивого ви-

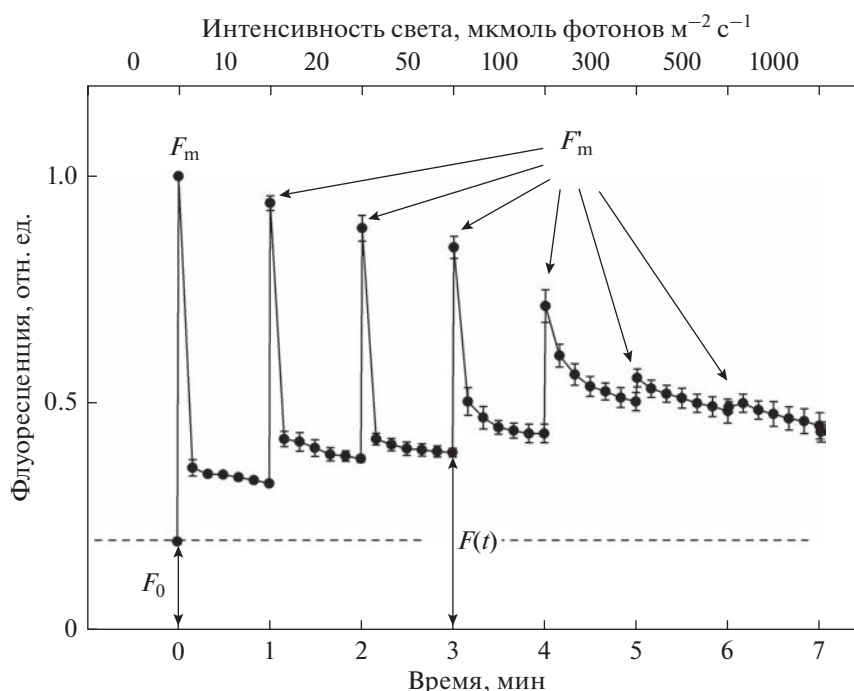


Рис. 5. Кинетика изменений выхода флуоресценции хлорофилла *a* в листьях *C. sativus*, акклимизированных в течение 5 недель к умеренному свету, при их освещении серией импульсов актиничного света ($\lambda_{\text{макс}} = 475$ нм) длительностью 1 мин различной интенсивности. Приведены средние значения ($n = 4$) $\pm$ стандартное отклонение.

да *C. melo* (дыня) различие значений q_E в листьях растений, акклимизированных к сильному и умеренному свету, выражено гораздо слабее, чем для теневыносливого вида *C. sativus* (огурец).

Электронный парамагнитный резонанс

Различие в фотосинтетических характеристиках листьев двух контрастных в отношении теневыносливости видов рода *Cucumis* (*C. sativus* и *C. melo*) проявляется и в кинетике редокс-превращений реакционных центров P_{700} . На рис. 7 показаны типичные кривые фотоиндуцированных изменений интенсивности сигнала ЭПР от P_{700}^+ в листьях растений, адаптированных к темноте в течение 10 мин. В ответ на включение белого света, возбуждающего обе фотосистемы, сигнал ЭПР от P_{700}^+ возрастает, достигая стационарного (квазистационарного) уровня. В листьях растений, адаптированных к темноте, как правило, наблюдается многофазная кинетика роста сигнала ЭПР [50]. Сразу после включения БС происходит небольшой скачок сигнала (A_0), затем наблюдается сравнительно медленный рост сигнала к стационарному уровню (рис. 7). Замедление роста концентрации P_{700}^+ обусловлено тем, что после адаптации листа к темноте ферменты ЦКБ инактивируются [8], а потому NADPH сначала по-

требуется медленно; вследствие избытка NADPH затрудняется отток электронов от ФС1 к NADP^+ . В то же время сохраняется приток электронов к ФС1 от ФС2, благодаря чему на начальных стадиях освещения уровень P_{700}^+ может отличаться от стационарного уровня $A_{\text{БС}}$. По мере освещения хлоропластов активируются реакции ЦКБ, а потому отток электронов от ФС1 ускоряется. При этом уменьшается приток электронов от ФС2 к P_{700}^+ , что происходит в результате закисления люмена и ослабления активности ФС2 вследствие усиления НФТ возбужденных состояний хлорофилла в светособирающей антенне ФС2. Наряду с этими изменениями, в хлоропластах может происходить перераспределение части энергии, поглощаемой антенной ФС2, в пользу ФС1 (переход состояние 1 $\rightarrow$ состояние 2) и перераспределение электронных потоков (нециклический/циклический транспорт электронов) в пользу нециклического потока [51, 52]. Все это должно способствовать росту сигнала ЭПР от P_{700}^+ .

Кинетика окисления P_{700} под действием непрерывного БС зависит от вида растений и условий их акклимации. Из рис. 7а видно, что в акклимизированных к умеренному свету листьях *C. sativus* сразу после включения БС наблюдается быстрый скачок сигнала (фаза A_0), вслед за этим концентрация P_{700}^+ монотонно возрастает до ста-

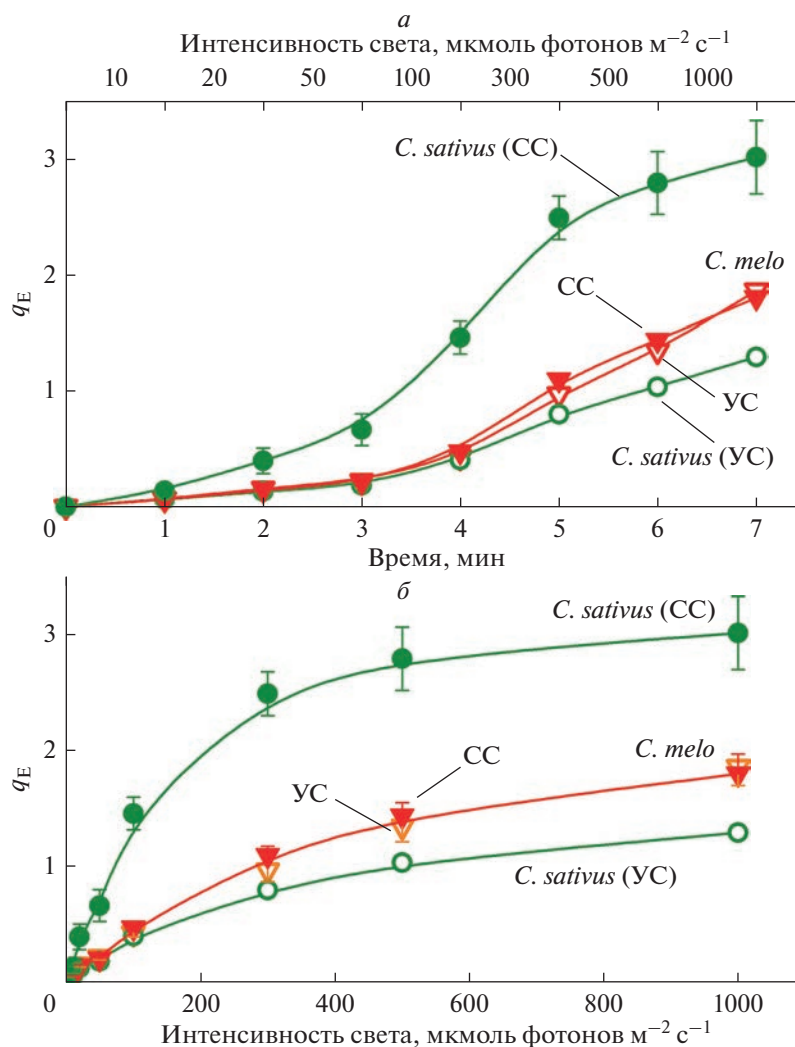


Рис. 6. Влияние интенсивности актиничного света на коэффициент нефотохимического тушения q_E , определяемый при действии серии импульсов актиничного света ($\lambda_{\text{макс}} = 475 \text{ нм}$) длительностью 1 мин возрастающей интенсивности. *a* – Кинетика нарастания q_E ; *б* – зависимость q_E от интенсивности актиничного света. Приведены средние значения ($n = 4$) $\pm$ стандартное отклонение.

ционного уровня $A_{\text{БС}}$. В листьях растений, акклимированных к сильному свету, после начального скачка сигнала до уровня A_0 , концентрация P_{700}^+ плавно возрастает до промежуточного уровня A_1 , а затем, после определенной лаг-фазы, сигнал достигает стационарного уровня $A_{\text{БС}}$. Интересно, что в листьях обоих видов растений (огурцы и дыни), акклимированных к умеренной освещенности, фотоокисление P_{700} происходит быстрее, чем у растений, акклимированных к сильному свету. В листьях дыни, акклимированной к сильному свету (рис. 7б), так же, как и в листьях огурца (рис. 7б), наблюдается заметная лаг-фаза в кинетике роста сигнала от P_{700}^+ .

Причины различий в кинетике фотоокисления P_{700} в листьях растений, акклимированных к

сильному и умеренному свету, пока остаются невыясненными. Можно предположить, что одной из причин задержки роста сигнала (лаг-фаза) у растений, акклимированных к СС, является увеличение вклада циклического электронного транспорта (ЦЭТ) вокруг ФС1, благодаря которому электроны возвращаются с акцепторного участка ФС1 к P_{700}^+ , что замедляет кинетику роста сигнала ЭПР от P_{700}^+ . Считается, что вклад ЦЭТ проявляется на начальных этапах освещения листьев, адаптированных к темноте [51–53], когда ЦКБ неактивен. Можно предположить, что в результате акклимации к сильному свету вклад ЦЭТ вокруг ФС1 возрастает. По мере активации ферментов ЦКБ отток электронов от ФС1 в ЦКБ усиливается, а потому относительный вклад циклического

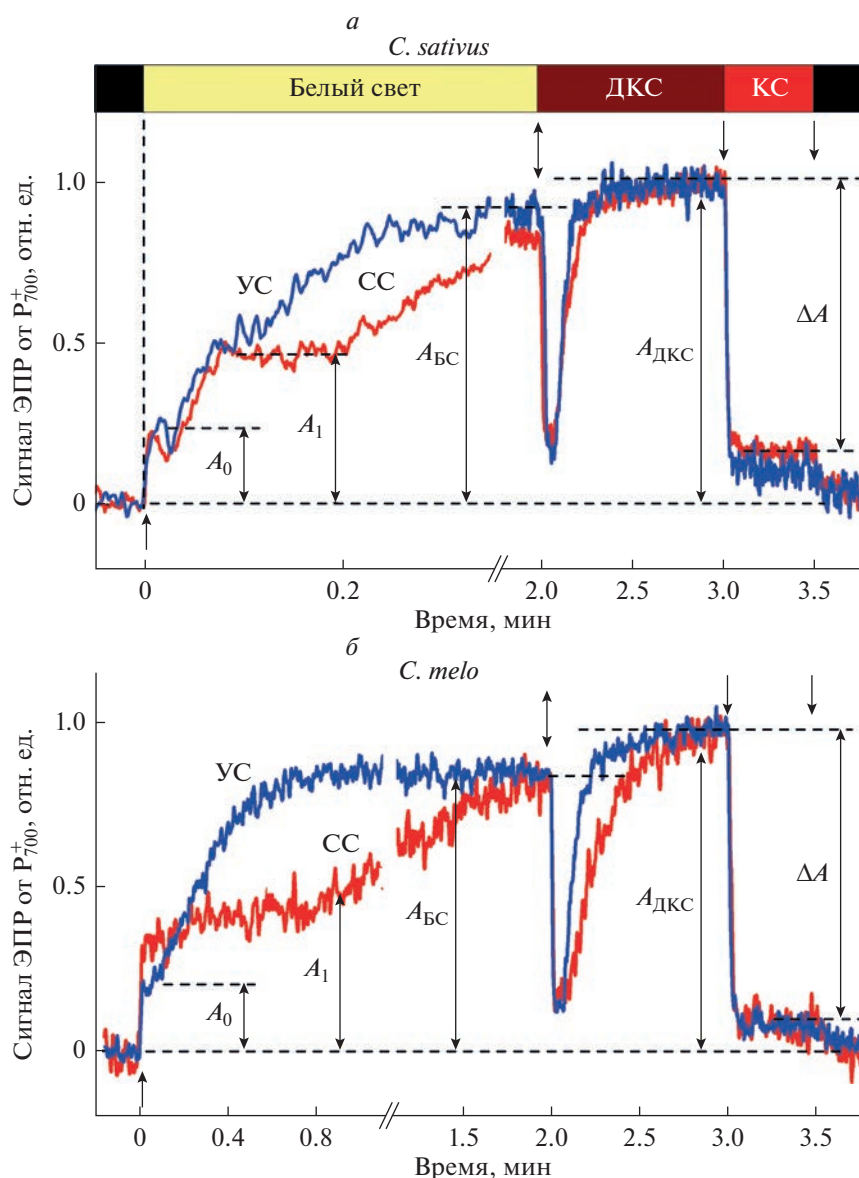


Рис. 7. Кинетика фотоиндуцированных изменений сигнала ЭПР от P_{700}^+ . После предварительного освещения образца белым светом в течение 1 мин (для стандартизации условий эксперимента), образец адаптировали к темноте в течение 10 мин. Затем включали белый свет (БС), через 2 мин БС переключали на дальний красный свет (ДКС, $\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$), который затем переключали на красный свет (КС, $\lambda_{\text{макс}} = 650 \text{ нм}$). Кинетические кривые нормированы на величину сигнала АДКС, индуцируемого при действии дальнего КС (ДКС). СС и УС — образцы растений, акклимированных к сильному и умеренному свету, соответственно.

транспорта в работу ЦЭТ ослабевает и сигнал ЭПР от P_{700}^+ начинает возрастать.

Отметим, что могут быть другие факторы, объясняющие появление характерной лаг-фазы, наблюдаемой у растений, акклимированных к сильному свету. Можно предположить, что лаг-фаза связана с более медленным переходом состояние 1 → состояние 2 у растений, выращиваемых на сильном свете. Не исключено, что это может быть вызвано изменениями в структурно-функ-

циональной организации ФС2, происходящими в ходе акклимации растений к сильному свету.

Сравнивая два вида растений рода *Cucumis*, мы обнаруживаем, что скорость фотоокисления P_{700} в листьях *C. melo* была ниже, чем в листьях *C. sativus*. Например, время полуокисления P_{700} ($\tau_{1/2}$) у *C. sativus*, акклимированных к слабому свету, составляло 0.1 мин, что вдвое меньше, чем у *C. melo*, выращенных при той же освещенности. Можно предположить, что это различие может быть обусловлено разным соотношением электрон-транс-

портных переносчиков и некоторыми особенностями метаболизма у этих двух видов растений.

После переключения БС на сравнительно слабый дальний красный свет (ДКС, $\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$), возбуждающий преимущественно ФС1, концентрация P_{700}^+ сначала падает, но затем монотонно возрастает до уровня $A_{\text{ДКС}}$. Падение сигнала после хроматического перехода БС $\rightarrow$ ДКС объясняется быстрым притоком электронов к P_{700}^+ (через цитохромный b_6f -комплекс и пластоцианин) от пула восстановленных переносчиков (это в основном молекулы пластохинола), накопившихся в ЭТЦ между ФС2 и ФС1 во время действия БС. Время полуспада сигнала от P_{700}^+ составляет $t_{1/2} \sim 5\text{--}30 \text{ мс}$ (в зависимости от длительности действия БС)³. Эти сравнительно короткие времена соответствуют переносу электронов от пластохинола к P_{700}^+ [54–57]. В дальнейшем, после реокисления переносчиков на участке между ФС2 и ФС1 за счет работы ФС1, сигнал от P_{700}^+ возрастает до уровня $A_{\text{ДКС}}$.

После следующего хроматического перехода ДКС $\rightarrow$ красный свет (КС, $\lambda_{\text{макс}} = 650 \text{ нм}$) происходит значительное уменьшение сигнала на величину ΔA , что обусловлено притоком электронов от ФС2 к ФС1, поскольку КС эффективно возбуждает обе фотосистемы. Интенсивность КС, возбуждающего ФС2 к ФС1, сопоставима с интенсивностью ДКС. Этого достаточно, чтобы обеспечить приток электронов от ФС2 к ФС1, но не хватает для поддержания высокого уровня P_{700}^+ . Параметр $\Delta A/A_{\text{ДКС}}$ может служить показателем эффективности работы ФС2. После выключения КС все центры P_{700}^+ восстанавливаются за счет притока электронов от эндогенных доноров [57, 58].

Соотношение сигналов от P_{700}^+ , индуцированных действием БС и ДКС (отношение $A_{\text{БС}}/A_{\text{ДКС}}$), зависит от условий акклимации растений. При длительной акклимации к сильному свету отношение $A_{\text{БС}}/A_{\text{ДКС}}$ возрастает, что может свидетельствовать об усилении относительного вклада циклического транспорта электронов вокруг ФС1 в процессы электронного переноса с участием ФС1.

Величина сигнала ЭПР от P_{700}^+ оказывается чувствительной к условиям произрастания растений. На рис. 8а показано, как амплитуда сигнала от P_{700}^+ , индуцируемого дальним красным светом в листьях *C. sativus* ($\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$, параметр $A_{\text{ДКС}}$), изменялась со временем акклимации растений. Обращает на себя внимание тот факт, что в ли-

стьях растений, освещавшихся сильным светом, по мере акклимации растений наблюдалось снижение величины сигнала. После 22 суток акклимации величина сигнала резко уменьшилась. Мы предполагаем, что это могло происходить вследствие светового стресса, повреждающего ФСА теневыносливого растения *C. sativus*. Действительно, при акклимации этого растения к умеренному свету за все время опыта значительного снижения сигнала ЭПР не наблюдалось.

В случае светолюбивого вида *C. melo* (рис. 8б) наблюдалась тенденция, обратная той, которую мы обнаружили для листьев теневыносливого вида *C. sativus*. При акклимации *C. melo* к сильному свету в течение первых 22 суток параметр $A_{\text{ДКС}}$ практически не менялся. При более длительной акклимации происходило уменьшение $A_{\text{ДКС}}$. В случае умеренной интенсивности света заметное падение $A_{\text{ДКС}}$ наблюдалось с самого начала акклимации. Это могло быть обусловлено как физиологическими причинами (уменьшение числа фотосинтетических комплексов), так и приборными эффектами, связанными с возможными анатомическими изменениями в листьях *C. melo*. Можно предположить, например, что по мере акклимации листьев *C. melo* их толщина и/или содержание влаги внутри листьев могли увеличиваться, что должно было бы способствовать росту диэлектрических потерь изучаемых образцов и, как следствие, приводить к уменьшению величины измеряемого сигнала ЭПР.

Описанные выше межвидовые различия в кинетике фотоиндуцированных превращений P_{700} в листьях *C. sativus* и *C. melo*, акклимированных к сильному или к умеренному свету, могут быть обусловлены разными регуляторными факторами, такими как деактивация/активации реакций ЦКБ и других метаболических процессов, усиление НФТ, ионная регуляция электронного транспорта между ФС2 и ФС1 за счет изменений pH внутри тилакоидов и в строме (pH_{in} и pH_{out}), “архитектурные” изменения в хлоропластах (переходы типа состояние 1 $\leftrightarrow$ состояние 2) и другие процессы (см. обзоры [58–63]). Выяснение структурно-функциональных изменений ФСА (включая соотношение антенных комплексов ФС1 и ФС2) и механизмов регуляции фотосинтеза при акклимации растений требует дальнейших исследований. Отметим сложный и не всегда однозначный характер изменений ФСА при акклимации растений. Так, например, при акклимации некоторых видов растений к сильному свету возрастает содержание ферментов ЦКБ, но при этом снижается относительное содержание комплексов ФС2 (см., например, работы [63, 64] и цитируемую в них литературу). Этим, вероятно, можно объяснить тот факт, что результаты исследований регуляторных процессов фотосинтеза разными мето-

³ Скорость восстановления P_{700}^+ измеряли оптическим методом, по разности поглощения света при 830 и 875 нм (методика описана в [57]).

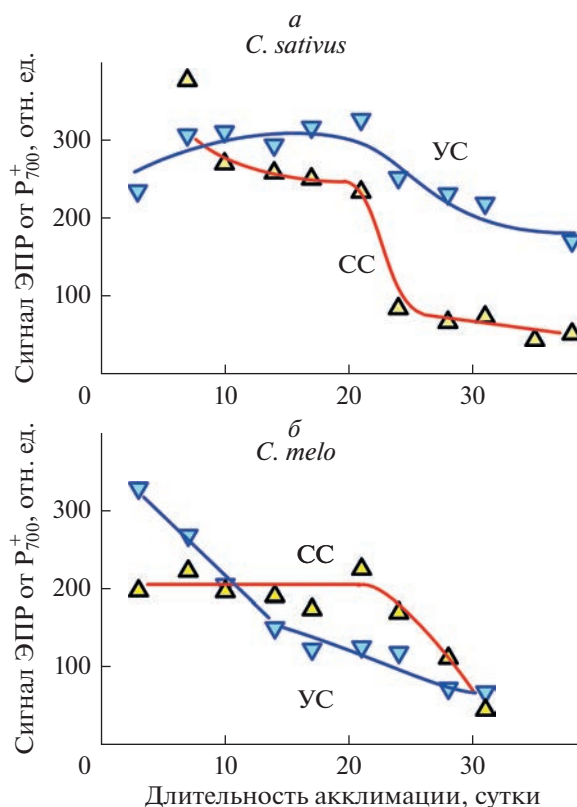


Рис. 8. Влияние длительности акклимации растений к сильному (СС) и умеренному (УС) свету на величину сигнала ЭПР от P_{700}^+ , индуцируемого дальним красным светом с $\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$.

дами (флуоресцентный анализ, ЭПР) могут быть интерпретированы по-разному.

Помимо изменений в структурно-функциональной организации ЭТЦ хлоропластов и взаимодействия их с другими метаболическими системами (митохондрии, малатный шунт, реакции ЦКБ), определенную роль в явлениях, связанных с условиями акклимации, и в повышении устойчивости растений к стрессовым факторам (избыточный свет), может играть антиоксидантная система защиты ФСА, а также влияние гормонального статуса растений (см., например, работы [8, 47–49, 60, 65–69]). Эти факторы, как правило, проявляются наиболее заметно у светолюбивых видов растений [28, 63], которые должны оперативно реагировать на значительные изменения естественных условий освещения, чтобы избежать повреждений ФСА в результате светового стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование листьев двух видов рода *Cucumis*, различающихся по светочувствительности, показало различие в динамике изменений фотосинтетических показателей теневыносливых (*C. sativus*) и светолюбивых (*C. melo*)

видов при длительной акклимации растений к свету сильной и умеренной интенсивности. Закономерности, характерные для МИФ и редокс-превращений P_{700} в листьях растений, выращенных на сильном и умеренном свете, отражают тот факт, что при акклимации растений к сильному свету у них вырабатывается способность быстрее реагировать на смену условий освещения: чем быстрее растения будут реагировать на усиление освещенности, тем успешнее они будут противостоять световому стрессу. Изучая кинетику МИФ, мы установили, что в листьях растений, выросших на сильном свете, флуоресценция в ходе МИФ спадает быстрее, чем в листьях растений, выросших при умеренной интенсивности света. Это является отражением того, что у растений, акклиматизированных к сильному свету, усиливается способность быстрее реагировать на смену условий освещения: чем быстрее растения реагируют на усиление освещенности, тем выше их устойчивость к световому стрессу. После акклимации растений к сильному свету удлиняется лаг-фаза на стадии роста сигнала P_{700}^+ на белом свете, что, вероятно, обусловлено увеличением вклада циклического транспорта электронов вокруг ФС1. Это может способствовать оптимизации энерге-

тического баланса и ослаблять световой стресс при избытке освещения.

Благодарности. Авторы признательны В.В. Птушенко за любезно предоставленный осветительный прибор и ценные консультации по вопросам физиологии растений.

Вклад авторов. М.А. Беньков — проведение долгосрочных опытов по измерению флуоресцентных характеристик листьев. И.С. Сусличенко — флуоресцентные измерения и получение данных методом ЭПР. Б.В. Трубицин — приборное обеспечение работы и ЭПР-измерения. А.Н. Тихонов — общий план работы, анализ литературных данных, подготовка графических материалов, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20047).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nelson N., Yocum C.F. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**, 521–565.
- Tikhonov A.N. 2014. The cytochrome *b₆f* complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways. *Plant Physiol. Biochem.* **81**, 163–183.
- Mamedov M., Govindjee, Nadtochenko V., Semenov A. 2015. Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms. *Photosynth. Res.* **125**, 51–63.
- Malone L.A., Proctor M.S., Hitchcock A., Hunter C.N., Johnson M.P. 2021. Cytochrome *b₆f* – Orchestrator of photosynthetic electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1862**, 148380. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148380>
- Höhner R., Pribil M., Herbstová M., Lopez L.S., Kunz H.-H., et al. 2020. Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 15354–15362.
- Junge W., Nelson N. 2015. ATP synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 631–657.
- Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. 2010. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТР-синтаза — вращающийся молекулярный мотор. *Успехи физических наук*, **180**, 931–956.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. 1986. *Фотосинтез С3 и С4 растений: механизмы и регуляция*. М.: Мир. 598 с.
- Allakhverdiev S.I., Murata N. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta.* **1657**, 23–32.
- Kono M., Terashima I. 2014. Long-term and short-term responses of the photosynthetic electron transport to fluctuating light. *J. Photochem. Photobiol. B.* **137**, 89–99.
- Berry J., Björkman O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491–543.
- Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P. 2008. Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **98**, 541–550.
- Tikhonov A.N., Vershubskii A.V. 2020. Temperature-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts *in vitro* and *in silico*. *Photosynth. Res.* **146**, 299–329.
- Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M.E., Francia F., Danon A., Marchand C.H., Fermani S., Trost P., Lemaire S.D. 2013. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: Something old, something new. *Front. Plant Sci.* **4**. Article 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Balsera M., Schumann P., Buchanan B.B. 2016. Redox regulation in chloroplasts. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 187–207.
- Rumberg B., Siggel U. 1969. pH changes in the inner phase of the thylakoids during photosynthesis. *Naturwissenschaften.* **56**, 130–132.
- Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A. 1999. How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.* **60**, 151–163.
- Tikhonov A.N. 2013. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.* **116**, 511–534.
- Schansker G. 2022. Determining photosynthetic control, a probe for the balance between electron transport and Calvin-Benson cycle activity, with the DUAL-KLAS-NIR. *Photosynth. Res.* **153**, 191–204.
- Lemeille S., Rochaix J.-D. 2010. State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynth. Res.* **106**, 33–46.
- Lichtenthaler H.K., Babani F. 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer, p. 713–736.
- Lichtenthaler H.K., Babani F., Navrátil M., Buschmann C. 2013. Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees. *Photosynth. Res.* **117**, 355–366.
- Puthiyaveetil S., Kirchhoff H., Höhner R. 2016. Structural and functional dynamics of the thylakoid membrane system. In: *Chloroplasts. Current research and fu-*

- ture trends. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 59–87.
24. Demmig-Adams B. 1998. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiol.* **39**, 474–482.
 25. Samoilova O.P., Ptushenko V.V., Kuvykin I.V., Kiselev S.A., Ptushenko O.S., Tikhonov A.N. 2011. Effects of light environment on the induction of chlorophyll fluorescence in leaves: A comparative study of *Tradescantia* species of different ecotypes. *BioSystems.* **105**, 41–48.
 26. Ptushenko V.V., Ptushenko E.A., Samoilova O.P., Tikhonov A.N. 2013. Chlorophyll fluorescence in the leaves of *Tradescantia* species of different ecological groups: Induction events at different intensities of actinic light. *BioSystems.* **114**, 85–97.
 27. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Benkov M.A., Minin A.A., Tikhonov A.N. 2016. Light acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species: Induction of chlorophyll *a* fluorescence and P₇₀₀ photooxidation, expression of PsbS and Lhcb1 proteins. *Photosynth. Res.* **130**, 275–291.
 28. Mishanin V.I., Trubitsin B.V., Patsaeva S.V., Ptushenko V.V., Solovchenko A.E., Tikhonov A.N. 2017. Acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species to growth light: Chlorophyll *a* fluorescence, electron transport, and xanthophyll content. *Photosynth. Res.* **133**, 87–102.
 29. Benkov M.A., Yatsenko A.M., Tikhonov A.N. 2019. Light acclimation of shade-tolerant and sun-resistant *Tradescantia* species: photochemical activity of PSII and its sensitivity to heat treatment. *Photosynth. Res.* **139**, 203–214.
 30. Suslichenko I.S., Tikhonov A.N. 2019. Photo-reducible plastoquinone pools in chloroplasts of *Tradescantia* plants acclimated to high and low light. *FEBS Lett.* **593**, 788–798.
 31. Randall R.P. 2012. A global compendium of weeds. 2nd edn. Department of Agriculture and Food, Western Australia, 1125 p.
 32. Лютова М.И., Тихонов А.Н. 1988. Сопоставление температурной зависимости подвижности липидо-растворимой спиновой метки в тилакоидных мембранах хлоропластов дыни и огурца. *Биофизика.* **33**, 460–464.
 33. Tikhonov A.N. 2021. Structure-function relationships in chloroplasts: EPR study of temperature-dependent regulation of photosynthesis, an overview. In: *Photosynthesis: molecular approaches to solar energy conversion*. Eds. Shen J.R., Satoh K., Allakhverdiev S.I. Advances in photosynthesis and respiration. **47**, p. 342–373.
 34. Li Z., Wakao S., Fischer B.B., Niyogi K.K. 2009. Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 239–260.
 35. Murata N, Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1767**, 414–421.
 36. Lazár D. 1999. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1412**, 1–28.
 37. Baker N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 89–113.
 38. Adams W.W. III, Demmig-Adams B. 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: *Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration*. Eds. Papageorgiou G.C., Govindjee G. Dordrecht: Springer, p. 583–604.
 39. Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Neubauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Seródio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: Practical issues. *Photosynth. Res.* **122**, 121–158.
 40. Kuvykin I.V., Ptushenko V.V., Vershoubisky A.V., Tikhonov A.N. 2011. Regulation of electron transport in C3 plant chloroplasts *in situ* and *in silico*. Short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**, 336–347.
 41. Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. 2015. Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J. Photochem. Photobiol. B.* **152**, 400–415.
 42. Stirbet A. 2012. Chlorophyll *a* fluorescence induction: A personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise. *Photosynth. Res.* **113**, 15–61.
 43. Stirbet A., Govindjee G. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the *OJIP* fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B.* **104**, 236–257.
 44. Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. 2006. Dark recovery of the Chl *a* fluorescence transient (*OJIP*) after light adaptation: The *qT*-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 787–797.
 45. Niyogi K.K., Truong T.B. 2013. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 307–314.
 46. Nilkens M., Kress E., Lambrev P., Miloslavina Y., Müller M., Holzwarth A.R., Jahns P. 2010. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1797**, 466–475.

47. Jahns P., Holzwarth A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 182–193.
48. Ruban A.V. 2016. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol.* **170**, 1903–1916.
49. Jallet D., Cantrell M., Peers G. 2016. New players for photoprotection and light acclimation. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 133–159.
50. Tikhonov A.N. 2015. Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview. *Photosynth. Res.* **125**, 65–94.
51. Bendall D.S., Manasse R.S. 1995. Cyclic phosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1229**, 23–38.
52. Strand D.D., Fisher N., Kramer D.M. 2016. Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts. In: *Chloroplasts: Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 89–100.
53. Johnson G.N. 2011. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**, 906–911.
54. Stiehl H.H., Witt H.T. 1969. Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. *Z. Naturforsch.* **24b**, 1588–1598.
55. Haehnel W. 1984. Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 659–693.
56. Bukhov N., Egorova E., Carpentier R. 2002. Electron flow to photosystem I from stromal reductants in vivo: The size of the pool of stromal reductants controls the rate of electron donation to both rapidly and slowly reducing photosystem I units. *Planta.* **215**, 812–820.
57. Suslichenko I.S., Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. 2022. The noninvasive monitoring of the redox status of photosynthetic electron transport chains in *Hibiscus rosa-sinensis* and *Tradescantia* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **185**, 233–243.
58. Eberhard S., Finazzi G., Wollman F.-A. 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 463–515.
59. Demmig-Adams B., Cohu C.M., Muller O., Adams III W.W. 2012. Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: From seconds to seasons. *Photosynth. Res.* **113**, 75–88.
60. Foyer C.H., Neukermans J., Queval G., Noctor G., Harbinson J. 2012. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* **63**, 1637–1661.
61. Murchie E.H., Ruban A.V. 2020. Dynamic non-photochemical quenching in plants: From molecular mechanism to productivity. *The Plant J.* **101**, 885–896.
62. Johnson M.P., Wientjes E. 2020. The relevance of dynamic thylakoid organization to photosynthetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**, 148039.
63. Ballottari M., Dall'Osto L., Morosinotto T., Bassi R. 2007. Contrasting behavior of higher plant Photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.* **282**, 8946–8958.
64. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J.B., Croce, R., Boekema, E. J. 2013. Highlight vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1827**, 411–419.
65. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, fifth ed., Oxford: Oxford University, 2007.
66. Wittkoop T.M., Saroussi S., Yang W., Grossman A.R. 2016. The GreenCut-Functions and relationships of proteins conserved in green lineage organisms. In: *Chloroplasts: Current research and future trends*. Ed. Kirchhoff H. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 241–278.
67. Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Vetoshkina D.V., Lubimov V.Y., Fedorchuk T.P., Naydov I.A., Kozuleva M.A., Rudenko N.N., Dall'Osto L., Cazzaniga S., Bassi R. 2015. Long-term acclimatory response to excess excitation energy: Evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size. *J. Exp. Bot.* **66**, 7151–7164.
68. Ivanov B.N., Borisova-Mubarakshina M.M., Kozuleva M.A. 2018. Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signalling by hydrogen peroxide. *Funct. Plant Biol.* **45**, 102–110.
69. Кулаева О.Н. 1982. Гормональная регуляция физиологических процессов у растений на уровне РНК и белка. М.: Наука, 82 с.

Effects of Plant Acclimation on Electron Transport in Chloroplast Membranes of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*

M. A. Benkov¹, I. S. Suslichenko¹, B. V. Trubitsin¹, A. N. Tikhonov^{1, *}

¹Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: an_tikhonov@mail.ru

In this work, we have studied photosynthetic electron transport in chloroplasts of two “contrasting” species of *Cucumis* genus, the shade-tolerant species *Cucumis sativus* (cucumber) and the light-loving species *Cucumis melo* (melon). Plants were acclimated to moderate (50–125 $\mu\text{mole photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or high light (850–1000 $\mu\text{mole photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Parameters of a fast induction of chlorophyll *a* fluorescence, emitted from

photosystem 2 (PS2), were determined using a conventional OJIP test. For monitoring the turnover of photosystem 1 (PS1) reaction centers P_{700}^+ , we used electron paramagnetic resonance. The shade-tolerant (*C. sativus*) and light-loving (*C. melo*) species, acclimation to high or low light irradiation, revealed substantial difference in their response to variations of light intensity. Photosynthetic activity of shade-tolerant species *C. sativus* revealed higher sensitivity to light intensity during acclimation as compared to *C. melo*. In the course of the long-term acclimation (more than 2 months) of *C. sativum* to high light ($\geq 500 \mu\text{mole photons m}^{-2} \text{ m}^{-1}$), a photochemical activity of PS2 decreased. This was not the case, however, for leaves of *C. melo*. In *C. sativus* leaves, a decrease in photochemical activity of PS2 caused by acclimation to high light was reversible, demonstrating the recovery after the attenuation of irradiation intensity. Plants of both species acclimated to high and low light also revealed significant differences in the two-phase kinetics of P_{700}^+ redox transients. In the leaves of plants acclimated to strong light, we observed a lag-phase in the kinetics of P_{700}^+ photooxidation that could be attributed to cyclic electron transport (CET) around PS1. The ratio of the signals induced by white light and far-red light (707 nm) was higher in plants acclimated to strong light. This effect can be explained by the enhancement of CET and optimization of the energy balance at excess of light, protecting plants from oxidative stress. The data obtained are discussed in the context of the problem of photosynthesis optimization upon fluctuations of light intensity.

Keywords: cucumis plants, acclimation, chlorophyll fluorescence induction, EPR

УДК 577.352.465

МОДЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОГО СЕНСОРА ПРОТОНА ВКУСОВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. К. Д. Сладков^а, *, С. С. Колесников^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: klimitrich@ya.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Семейство отопетринов (otopetrins) — это группа мембранных белков, формирующих протон-селективные ионные каналы. Один из его представителей, белок Otop1, является кандидатом на роль молекулярного сенсора кислого во вкусовых клетках типа III. Считается, что кислые стимулы инициируют входящий ток ионов H^+ через апикальную мембрану этих клеток, что приводит к их деполяризации и генерации серии потенциалов действия, инициирующих выброс афферентного нейротрансмиттера. Математическое моделирование является одним из подходов к анализу этого достаточно сложного динамического процесса, многие аспекты которого трудно исследовать экспериментально. В данной работе разрабатывалась математическая модель для описания динамических и транспортных характеристик молекулярного сенсора Otop1. Полученная модель адекватно описывает характеристики протонного тока, транспортируемого Otop1, и может быть использована в дальнейшем для теоретического анализа трансдукции кислых стимулов во вкусовых клетках.

Ключевые слова: вкусовые клетки, Otop1, протонный ток

DOI: 10.31857/S023347552303009X, **EDN:** EXKXJQ

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная единица периферической вкусовой системы млекопитающих — вкусовая почка — представляет собой гетерогенную популяцию 50–80 клеток, включая вкусовые клетки типа I, II, III и базальные клетки [1, 2]. Эти клетки отличаются морфологически, функционально, а также на молекулярном уровне, экспрессируя гены рецепторных, сигнальных и канальных белков в разных сочетаниях. Базальные клетки считаются прогениторными клетками вкусовой почки, способными дифференцироваться во взрослые вкусовые клетки различного типа. Примерно половину популяции клеток вкусовой почки составляют клетки типа I, которые выполняют преимущественно поддерживающую функцию [1, 2]. Вкусовые клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов, а также стимулов категории умами (аминокислоты, рибонуклеотиды, пептиды). Они составляют 30–40% клеток вкусовой почки. Клетки типа III (10–15% популяции) распознают кислые и некоторые соленые стимулы [1, 2]. Хотя исследования последних лет выявили в группе III субпопуляцию клеток, способных отвечать на вещества категорий горькое, сладкое и умами [3], ос-

новная специализация клеток типа III — это рецепция кислых стимулов. В пользу этого свидетельствует тот факт, что при селективном удалении клеток типа III из вкусовой почки с использованием генно-инженерных методов у генно-модифицированных животных исчезают ответы вкусового нерва и поведенческие реакции на кислые стимулы, но не на горькие, сладкие и умами [4].

Ощущения кислого и соленого связаны преимущественно с простыми ионными стимулами: H^+ в первом случае и Na^+ (и некоторые другие катионы) во втором [5]. Специализированные ионные каналы, функционирующие на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, традиционно рассматривались как вероятные молекулярные сенсоры ионных стимулов [5]. В свете исследований последних лет, среди множественных кандидатов, предлагавшихся на роль молекулярного сенсора кислого, недавно открытый H^+ -селективный канал otopetrin1 (Otop1) представляется наиболее подходящим [6–8].

Основная задача вкусовой трансдукции — это хомоэлектрическое сопряжение, т.е. стимул-зависимая генерация электрического сигнала, управляющего выбросом афферентного нейротрансмиттера, кодирующего сенсорную информацию. Многие аспекты этого процесса окончательно не

ясны, в частности, потому что вклад различных элементов трансдукционной машинерии в ее динамические характеристики невозможно определить экспериментально. Математическое моделирование сложных динамических систем часто является ключевым подходом для анализа их свойств. Задачу математического моделирования трансдукции кислого можно разделить на подзадачи, одной из которых является моделирование динамических и транспортных характеристик молекулярного сенсора Otop1. Данная работа посвящена разработке кинетической модели H^+ -селективного канала Otop1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аксиоматика модели

По первичной последовательности белки Otop существенно отличаются от других изученных канальных белков [9, 10], указывая на то, что семейство Otop представляет собой особую группу ионных каналов со специфической структурой и физиологической функцией. Использование криоэлектронной микроскопии позволило установить пространственную структуру Otop1 рыбы-зебры, Otop3 цыпленка и Otop3 лягушки *Xenopus* [9, 10]. Оказалось, что для этих ортологов Otop характерна консервативная топология. В частности, было показано, что в мембране они формируют гомодимеры, в которых каждая субъединица включает 12 трансмембранных сегментов (S1–S12), формирующих два домена: N (S1–S6) и C (S7–S12) [9, 10]. N- и C-домены формируют топологически сходные бочкообразные структуры (рис. 1а). Механизмы, которые обеспечивают рН-зависимую активацию каналов Otop и трансмембранный перенос протонов, во многом не ясны. В недавнем исследовании Otop1 человека было показано, что экстраклеточная петля S5–S6 в домене N (рис. 1а) играет ключевую роль в его функционировании. Гистидин H229 в петле S5–S6 является первичным H^+ -сенсором, и его протонирование инициирует конформационные изменения петли, что обеспечивает доступ к протонной поре в домене C [11].

Следует отметить, что практически для всех исследованных одиночных ионных каналов характерно чередование периодов молчания и относительно продолжительной активности (burst), внутри которой наблюдаются быстрые переходы между открытым и закрытым состояниями, так называемый фликеринг (flickering) (например, [12]). Хотя ток через одиночный канал Otop1 не исследовался, можно думать, что его активность также характеризуется сложной кинетикой: относительно медленные рН-зависимые конформационные изменения в петле S5–S6 могут обеспечивать переход Otop1 в активное состояние, в котором он способен транспортировать протон,

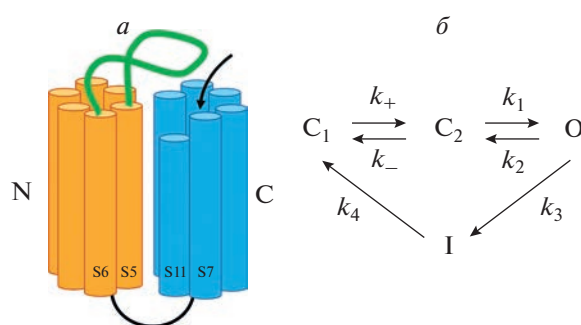


Рис. 1. Модель протонного канала Otop1. а – Схематичное изображение структуры канала Otop1. Стрелка указывает на предполагаемую локализацию протонной поры. б – Схема переходов между состояниями Otop1.

тогда как конформационные флуктуации протонной поры вызывают ее фликеринг. Следует также отметить, что внутриклеточный Ca^{2+} является не только универсальным регулятором, но и медиатором клеточной гибели [13, 14]. В силу этого Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы плазмалеммы обычно “охвачены” отрицательной обратной связью, которая приводит к ингибированию входа Ca^{2+} при опасном уровне Ca^{2+} в цитозоле [15–19]. Вход протона через Otop1 приводит к закислению цитоплазмы вкусовой клетки до опасного уровня, вызывая массовое изменение биохимических реакций. Представляется поэтому правдоподобным, что, по аналогии с Ca^{2+} -зависимой регуляцией Ca^{2+} -каналов, Otop1 должен инактивироваться при понижении внутриклеточного рН. Исходя из приведенных соображений, мы рассмотрели следующую кинетическую схему рН-зависимых переходов Otop1 между различными состояниями (рис. 1б). Здесь символы C_1 , C_2 , O и I означают два закрытых, открытое и инактивированное состояния, соответственно. Конформационные изменения, инициируемые в петле S5–S6 протонированием, переводят канал из неактивного состояния C_1 в активированное, но закрытое состояние C_2 , из которого возможны переходы в открытое состояние O, – фликеринг. Из открытого состояния канал может переходить в инактивированное состояние I со скоростью, зависящей от внутриклеточного рН. Выход из инактивированного состояния возможен только в состояние C_1 .

Предположение о том, что k_+ зависит от концентрации внеклеточного протона H_o связано с тем, что в эксперименте наблюдалась более быстрая активация тока через Otop1 при аппликации более кислого стимула [7]. Введение рН-зависимой константы перехода из C_1 в C_2 в форме $k_+(H_o) = k_+^0 \frac{H_o}{H_{1/2}^o + H_o}$ позволило правильно описать кинетику активации протонного тока. В ран-

них работах предполагалось отсутствие инактивации Otop1 при закислении клетки, и уменьшение протонного тока со временем объяснялось только убыванием потенциала реверсии [7]. Это предположение согласуется с выявленными в эксперименте экспоненциальным законом уменьшения тока через Otop1 и линейной зависимостью между скоростью уменьшения тока и величиной пикового тока [20]. Однако оказалось, что при больших концентрациях внеклеточного протона степень уменьшения тока была выше, чем можно было предсказать по убыванию потенциала реверсии. В этой связи мы постулировали, что имеет место инактивация Otop1, зависящая от внутриклеточного pH. В модели такая инактивация описывается тем, что константа скорости перехода в инактивированное состояние k_3 определялась как функция H_i в соответствии с уравнением

$$k_3(H_i) = k_3^0 \frac{H_i}{H_{1/2}^i + H_i}, \text{ что позволило правильно}$$

предсказать степень инактивации протонного тока.

Следует также отметить, что нами рассматривалось несколько кинетических схем, среди которых минимальная модель (рис. 1б) оказалась наиболее адекватной для реконструкции основополагающих экспериментальных фактов, характеризующих функционирование Otop1.

Уравнения модели

Электрофизиологический анализ Otop1 в экспрессионной системе показал, что протонный ток через этот канал описывается линейными вольт-амперными характеристиками со сдвигом потенциала реверсии, зависящим от экстраклеточного pH [7]. Это означает, что, по сути, Otop1 является потенциал-независимым каналом и что транспортируемый протонный ток практически подчиняется закону Ома. В этой связи интегральный протонный ток, транспортируемый ансамблем N каналов Otop1 описывался нами выражением:

$$I = \gamma NP_0(V - E_r) = \gamma NP_0 \left(V - \frac{RT}{F} \lg \left(\frac{H_o}{H_i} \right) \right), \quad (1)$$

где γ — величина проводимости одиночного открытого канала Otop1, N — общее число протонных каналов, P_0 — потенциал-независимая вероятность найти канал в открытом состоянии, V — потенциал клетки, а E_r — потенциал реверсии тока, который можно рассчитать из уравнения Нернста через H_o и H_i , концентрации свободных протонов вне и внутри клетки, R — универсальная газовая постоянная, T — температура, F — число Фарадея.

В экспериментах с рекомбинантным Otop1 было установлено, что при скачкообразном за-

кислении внеклеточной среды протонный ток сначала резко возрастает за 100–250 мс, после чего величина тока экспоненциально убывает до некоторого значения в течение нескольких секунд [7]. Резкий рост тока связывался с переходом канала в открытое состояние под действием внеклеточного протона, а его убывание объяснялось закислением цитозоля и уменьшением потенциала реверсии [7]. Для описания динамических характеристик протонного тока мы использовали следующую систему дифференциальных уравнений, соответствующую переходам Otop1 между состояниями в соответствии с кинетической схемой (рис. 1б):

$$\begin{aligned} \dot{C}_1 &= k_4 I + k_- C_2 - k_+ (H_o) C_1, \\ \dot{C}_2 &= k_+ (H_o) C_1 - (k_- + k_1) C_2 + k_2 O, \\ \dot{O} &= k_1 C_2 - (k_2 + k_3(H_i)) O, \\ \dot{I} &= -k_4 I + k_3(H_i) O, \end{aligned} \quad (2)$$

где O , C_1 , C_2 , I — вероятности найти канал в открытом, закрытых и инактивированном состояниях, k_i — соответствующие константы скоростей перехода.

Хотя при входе в клетку протоны связываются с протонным буфером и частично откачиваются протонными насосами во внеклеточную среду, протонный ток приводит к закислению цитозоля [7]. Чтобы смоделировать этот процесс, использовалось соотношение (3). Первое равенство в (3) выражает связь между падением внутриклеточного pH и ростом тотальной концентрации протонов (как свободных, так и связанных) через коэффициент β . Если бы свободные протоны не связывались с буфером, протонный ток в 10 пА за секунду приводил бы к изменению внутриклеточного pH в клетке объемом около 150 фл с начальных 6.9 до 3.5 менее чем за 1 с. Однако имеющиеся данные указывают на более медленные изменения pH цитозоля вкусовых клеток [20]. На основе этих данных и предполагая, что буфер линейный, величина β была оценена нами как 54 мМ на единицу pH.

Второе равенство в (3) описывает транспорт протонов через мембрану: первое слагаемое описывает рост концентрации внутриклеточных протонов H_i из-за поступающих через Otop1 протонов, а второе слагаемое — откачку H^+ протонными помпами:

$$-p\dot{H}_i = \frac{\dot{H}^{\text{tot}}}{\beta} = \frac{1}{\beta} \left(\frac{I}{FV} - \frac{H_i^2}{H_i + H_{0.5}} \frac{1}{\tau_{\text{out}}} \right), \quad (3)$$

Таблица 1. Параметры модели, при которых симулировались токи (рис. 2)

Параметр	Величина, мс^{-1}	Параметр	Величина
k_+^0	0.002	V	177 фл
k_-	0.002	$H_{1/2}^o$	8 мкМ
k_1	1	$H_{1/2}^i$	10 мкМ
k_2	1	$H_{0.5}$	0.5 мкМ
k_3^0	1	τ_{out}	2 мс
k_4	0.1	β	54 мМ/рН

где V — объем клетки, H^{tot} — общая концентрация обмениваемых протонов в цитозоле, $H_{0.5}$ — концентрация свободных ионов H^+ , при которой скорость их откачки равна половине от максимальной, τ_{out} — характерное время откачки H^+ из клетки.

Величины параметров в данной модели подбирались таким образом, чтобы параметры протонного тока, полученные в вычислительных экспериментах, соответствовали параметрам, определенным экспериментально, включая зависимость времен активации и инактивации тока от интенсивности кислого стимула H_o [7, 21, 22].

Чтобы моделировать динамические свойства тока через Otop1 при скачкообразном закислении внеклеточной среды, уравнения (1)–(3) решались

численно методом Эйлера с шагом в 0.025 мс. Вычисления производились с использованием авторской программы на языке Python. Уменьшение шага интегрирования вдвое не приводило к заметному изменению результатов. При физиологических pH_o 7.4 и pH_i 6.9 положение равновесия достигалось при вероятности обнаружить канал в состоянии S_1 , равной 0.994. Поэтому при моделировании система помещалась около положения равновесия ($S_1(t=0) = 0.99$) и находилась возле него до подачи стимула.

Как следует из эксперимента, инактивация тока через Otop1 связана преимущественно с закислением цитозоля, и этот процесс происходит медленно в сравнении с его активацией [7, 20]. Это позволяет на малых временах пренебречь инактивацией каналов и оценить значение пикового то-

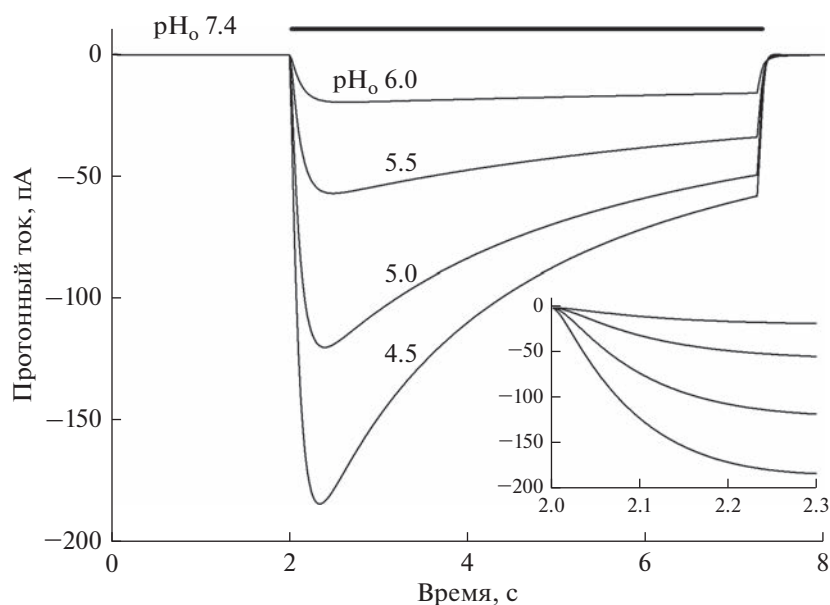


Рис. 2. Динамика протонного тока через Otop1 в ответ на кислые стимулы разной интенсивности. Момент стимуляции показан отрезком линии выше кривых тока, цифры над кривыми указывают рН кислого стимула. Вставка в уменьшенном масштабе времени иллюстрирует ускорение активации тока при уменьшении рН стимула.

ка из условия равенства нулю производной тока. Фактически это соответствует стационарному состоянию для системы (2), что дает следующее выражение для пикового тока как функции концентрации внеклеточного протона H_o :

$$I_{\text{peak}} = \gamma N \times \frac{1}{1 + \frac{k_3}{k_4} + \frac{k_2 + k_3}{k_1} + \frac{1}{k_+ (H_o)} \left(\frac{k_- (k_2 + k_3)}{k_1} + k_3 \right)} \times \left(V - \frac{RT}{F} \lg \left(\frac{H_o}{H_i} \right) \right). \quad (4)$$

Эта зависимость позволяет непосредственное сравнить предсказания модели и экспериментальные данные [7, 20–22].

Таким образом, предлагаемая модель (рис. 1б) адекватно описывает основные свойства тока через протонный канал Otop1 и может в дальнейшем быть использована для моделирования процесса трансдукции кислых стимулов во вкусовых клетках типа III.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00032.

Соответствие принципам этики. В работе не проводились эксперименты с животными и людьми.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roper S.D., Chaudhari N. 2017. Taste buds: Cells, signals and synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 485–497.
2. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foscett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
3. Banik D.D., Benfey E.D., Martin L.E., Kay K.E., Loney G.C., Nelson A.R., Ahart Z.C., Kemp B.T., Kemp B.R., Torregrossa A., Medler K.F. 2020. A subset of broadly responsive Type III taste cells contribute to the detection of bitter, sweet and umami stimuli. *PLoS Genet.* **16**, e1008925.
4. Huang A.L., Chen X., Hoon M.A., Chandrashekar J., Guo W., Trankner D., Ryba N.J., Zuker C.S. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature.* **442**, 934–938.
5. Lindemann B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature.* **413**, 219–225.
6. Ishimaru Y. 2015. Molecular mechanisms underlying the reception and transmission of sour taste information. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 171–176.
7. Tu Y.H., Cooper A.J., Teng B., Chang R.B., Artiga D.J., Turner H.N., Mulhall E.M., Ye W., Smith A.D., Liman E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* **359**, 1047–1050.
8. Liman E.R., Kinnamon S.C. 2021. Sour taste: receptors, cells and circuits. *Curr. Opin. Physiol.* **20**, 8–15.
9. Chen Q., Zeng W., She J., Bai X.C., Jiang Y. 2019. Structural and functional characterization of an otopenin family proton channel. *Elife.* **8**, e46710.
10. Saotome K., Teng B., Tsui C.C.A., Lee W.H., Tu Y.H., Kaplan J.P., Sansom M.S.P., Liman E.R., Ward A.B. 2019. Structures of the otopenin proton channels Otop1 and Otop3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 518–525.
11. Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z., Chaudhry H., Agbaje Z., Ulloa G.A., Yu Y. 2022. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otop1 proton channel. *Commun. Biol.* **5**, 1110.
12. Geng Y., Magleby K.L. 2015. Single-channel kinetics of BK (Slo1) channels. *Front. Physiol.* **5**, 532.
13. Cerella C., Diederich M., Ghibelli L. 2010. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 546163.
14. Shi H., Gu J. 2021. Calcium signaling mediates cell death and crosstalk with autophagy in kidney disease. *Cells.* **10**, 3204.
15. Budde T., Meuth S., Pape H.C. 2002. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 873–883.
16. Halling D.B., Aracena-Parks P., Hamilton S.L. 2005. Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci. STKE.* **315**, re15.
17. Mullins F.M., Park C.Y., Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Aldrich R.W. 2009. Stim1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 15495–15500.
18. Parekh A.B. 2017. Regulation of CRAC channels by Ca^{2+} -dependent inactivation. *Cell Calcium.* **63**, 20–23.
19. Limpitkul W.B., Greenstein J.L., Yue D.T., Dick I.E., Winslow R.L. 2018. A bilobal model of Ca^{2+} -dependent inactivation to probe the physiology of L-type Ca^{2+} channels. *J. Gen. Physiol.* **150**, 1688–1701.
20. Bushman J.D., Ye W., Liman E.R. 2015. A proton current associated with sour taste: Distribution and functional properties. *The FASEB J.* **29**, 3014–3026.
21. Teng B., Wilson C.E., Tu Y.H., Joshi N.R., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2019. Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otop1. *Current Biology.* **29** (21), 3647–3656.
22. Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Krieger Z., Tu Y.H., Burendei B., Ward A.B., Liman E.R. 2022. Structural motifs for subtype-specific pH-sensitive gating of vertebrate otopenin proton channels. *eLife* **11**, 77946.

Model of a Molecular Proton Sensor in Taste Cells

K. D. Sladkov^{1, *}, S. S. Kolesnikov¹

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

**e-mail: klimitrich@ya.ru*

Otopetrins represents a group of membrane proteins that function as proton-selective ion channels. Existing evidence indicates that Otop1, the eponym of the family, is a likely molecular sensor of protons involved in detecting acid stimuli in taste cells of type III. Acid stimuli is believed to initiate an inward current carried by protons through receptive apical membrane to depolarize a type III cell and trigger a train of action potentials driving afferent neurotransmission. While many details of this rather complicated process have not been uncovered yet, mathematical modelling could provide a sufficient insight into sour transduction. Here we present a mathematical model for describing dynamic and transport properties of Otop1 channel. The elaborated model appropriately describes proton currents through Otop1 under different conditions, and it could be employed for further modeling of sour responses of taste cells.

Keywords: taste cells, Otop1, proton current

АКТИВАЦИЯ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПОДАВЛЯЕТ ГИПЕРВОЗБУЖДЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СЕТЕЙ ГИППОКАММПА КРЫСЫ *IN VITRO*

© 2023 г. С. А. Майоров^а, Б. К. Кайрат^б, С. Г. Гайдин^а,
А. М. Косенков^а, В. П. Зинченко^{а, *}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

^бКазахский национальный университет имени аль-Фараби,
Алматы, 050040 Республика Казахстан

*e-mail: vprz@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

Каннабиноидные (CB) рецепторы играют ключевую роль в различных физиологических процессах в организме, включая нейрогенез, синаптическую пластичность, иммунную модуляцию, апоптоз, а также участвуют в регуляции метаболизма, деятельности сердечно-сосудистой и репродуктивной систем. Поскольку многие каннабиноидные рецепторы подавляют гипервозбуждение и защищают клетки от гибели, то методы модуляции их активности имеют терапевтические перспективы при лечении таких патологий нервной системы, как психические расстройства, эпилепсия, болезни Паркинсона и Гентингтона, рассеянный склероз, травмы спинного и головного мозга. В данной работе приведены экспериментальные данные, демонстрирующие эффекты агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на индуцированные осцилляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в двух клеточных моделях эпилептиформной активности. Для исследования нейропротекторных свойств WIN 55,212-2 гипервозбуждение вызывали добавлением антагониста ГАМК(A)-рецепторов, бикукуллина, или возбуждающих доз хлорида аммония. Как показали эксперименты, WIN 55,212-2 в концентрации от 100 нМ и выше заметно подавляет частоту кальциевых колебаний и снижает базальный уровень $[Ca^{2+}]_i$. При этом амплитуда колебаний в присутствии агониста также снижалась. WIN 55,212-2 в концентрации 2 мкМ подавлял вызванные хлоридом аммония кальциевые колебания во всех нейронах, но вызывал импульсное бифазное повышение базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в 20% астроцитов. Таким образом, в данной работе с использованием различных моделей гипервозбуждения нейрональных сетей продемонстрировано потенциальное противоэпилептическое действие агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2.

Ключевые слова: каннабиноидные рецепторы, внутриклеточный кальций, астроциты, нейроны, гипервозбуждение нейрональных сетей

DOI: 10.31857/S0233475523030076, **EDN:** EWTFEV

ВВЕДЕНИЕ

Гипервозбуждение в нейрональных сетях головного мозга возникает вследствие травм или дегенеративных процессов и является ключевым патофизиологическим механизмом при некоторых неврологических заболеваниях, таких как эпилепсия, начальная стадия инсульта, болезнь Альцгеймера [1, 2]. Длительное гипервозбуждение может быть причиной повреждения и гибели отдельных популяций нейронов в мозге [3]. На сегодняшний день стратегия лечения многих нейродегенеративных нарушений основана на снятии гипервозбуждения путем прямого подавления активности опосредующих возбуждение нейронов ионных

каналов и рецепторов. Эта стратегия не всегда работает успешно, поскольку некоторые пациенты с неврологическими расстройствами невосприимчивы к традиционному медикаментозному лечению, что требует разработки нового более селективного неинвазивного терапевтического подхода [4, 5]. Альтернативными кандидатами для использования в качестве терапевтических соединений рассматриваются агонисты каннабиноидных (CB) рецепторов.

Каннабиноидные рецепторы представляют собой класс сопряженных с G_i -белками рецепторов, которые опосредуют биологические эффекты фитоканнабиноидов, эндоканнабиноидов и

синтетических каннабимиметических соединений [6]. Рецепторы этого семейства широко распространены в организме человека и их разделяют на два типа: СВ₁-рецепторы и СВ₂-рецепторы. СВ₁-рецепторы в основном экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС) [7]. Они привлекают к себе большое внимание, поскольку участвуют в модуляции различных функций мозга, включая формирование памяти и эмоционального компонента поведения, либо посредством прямого воздействия продуктов эндоканнабиноидной системы, либо через воздействие на глутаматергическую, ГАМКергическую и дофаминергическую системы. Нокаут гена СВ₁-рецептора у мышей вызывает спонтанные судороги и оказывает проконвульсантный эффект в каинатной и пилокарпиновой моделях эпилепсии [8, 9]. Ранее считалось, что в отличие от СВ₁-рецептора, СВ₂-рецепторы преимущественно экспрессируются в тканях/органах иммунной системы, таких как селезенка, миндалина, тимус и лимфоидные ткани [10]. Однако при определенных заболеваниях СВ₂-рецепторы индуцибельно экспрессируются в ЦНС. Вначале было показано, что при нейродегенеративных расстройствах, например, при болезни Гентингтона, экспрессия СВ₂-рецепторов в головном мозге значительно повышается [11]. Затем функциональные СВ₂-рецепторы были обнаружены во всей ЦНС. СВ₂-рецепторы в основном локализованы постсинаптически, и их активация приводит к гиперполяризации нейронов и, следовательно, к снижению возбудимости [12–15].

Доказано, что каннабиноиды обладают противосудорожными свойствами [16]. СВ₁-рецепторы могут модулировать нейротрансмиссию, подавляя высвобождение ГАМК и глутамата из пресинаптических терминалей. Этот ретроградный процесс был предложен в качестве основного механизма нейропротекторного действия эндогенных каннабиноидов против глутаматной эксайтотоксичности – патологического процесса, характерного для многих неврологических расстройств, включая эпилепсию и нейродегенеративные заболевания [7, 17–19]. Несмотря на многочисленные публикации, демонстрирующие участие СВ-рецепторов в защите мозга от гипервозбуждения, полное понимание механизмов противоэпилептического действия каннабиноидов отсутствует. Проблема состоит не только в том, что известны не все эндогенные каннабиноиды (ECBs), рецепторы и ферменты (фосфодиэстеразы), производящие ECBs, но и в том, что СВ-рецепторы мозга могут быть локализованы в разных типах тормозных [20] и возбуждающих [21] нейронов как пресинаптически, так и постсинаптически. СВ-рецепторы нейронов сопряжены с G_{i/o}-белками, мишенями которых являются аденилатциклаза,

потенциал-зависимые кальциевые и калиевые каналы. В зависимости от локализации рецептора, тормозной потенциал их активаторов будет преимущественно реализовываться либо через уменьшение концентрации Ca²⁺, либо через изменение электрического потенциала. Также стоит отметить, что СВ-рецепторы обнаружены и на астроцитах, где они активируют каскад кальциевой сигнализации с участием фосфолипазы C [22]. Показано, что кальциевый сигнал в астроцитах вызывает секрецию глутамата, ГАМК, АТР [23, 24], которые модулируют функциональную активность нейронов.

На сегодняшний день синтезировано большое количество агонистов каннабиноидных рецепторов, в том числе и полных агонистов (активируют СВ₁- и СВ₂-рецепторы), таких как WIN 55,212, mAEA, HU210 и другие, однако их применение в качестве лекарственных средств все еще ограничено, что объясняется не только до конца неизученными молекулярными механизмами, но и наркотическим потенциалом, способностью нарушать когнитивные функции, в том числе кратковременную память, а также сравнительно быстрым развитием толерантности в отношении их наиболее важных эффектов [25]. К тому же известные агонисты СВ-рецепторов не обладают специфичностью в отношении отделов головного мозга. Данная работа посвящена изучению эффектов наиболее часто используемого в исследованиях и демонстрирующего умеренную селективность по отношению к СВ₁-рецепторам агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на индуцированные осцилляции внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в различных клеточных моделях эпилептиформной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты в данном исследовании были проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Приготовление культуры клеток. В экспериментах использовались смешанные культуры клеток гиппокампа, выделенные из головного мозга новорожденных крыс линии Wistar (1–3 дневного возраста). Извлеченный после декапитации гиппокамп помещали в холодный раствор Версена, не содержащий ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, и измельчали ножницами. Для ферментативной деградации фрагментов ткани, измельченный биоматериал инкубировали с добавлением 1% раствора трипсина в течение 10 мин при 37°C при постоянном перемешивании на шейкере (600 об/мин). После этого ткань отмывали холодной средой Neurobasal-A для инактивации трипсина. Затем фрагмен-

ты ткани осторожно пипетировали, а крупные неизмельченные фрагменты осторожно удаляли. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 3 мин при 500g и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в среде Neurobasal-A с добавлением бессывороточного супплемента B-27 (2%), глутамин (0.5 мМ), пенициллина-стрептомицина (1 : 100). После этого клетки высеивали на круглые покровные стекла диаметром 25 мм, предварительно покрытые полиэтиленмином и помещенные в стерильные чашки Петри диаметром 35 мм. Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в среде с содержанием 5% CO₂ и влажности 95%. Одну треть объема среды для культивирования клеток заменяли свежей средой каждые 3–4 дня. В экспериментах использовали культуры клеток в возрасте 13–14 дней *in vitro* (DIV).

Флуоресцентная визуализация изменений [Ca²⁺]_i.

Для регистрации изменений [Ca²⁺]_i в клетках гиппокамп использовали ратиометрический Ca²⁺-чувствительный зонд Fura-2. Клетки загружали зондом (5 мМ), растворенным в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем (в мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 10 глюкозы, 10 HEPES, pH 7.35. Культуру клеток инкубировали с зондом в течение 40 мин при 37°C с последующей отмывкой. Для визуализации флуоресценции Fura-2 использовали моторизованный инвертированный микроскоп Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия) с объективом HC PL APO 20×/0.7 IMM. Микроскоп был оснащен высокоскоростной монохромной CCD-камерой Hamamatsu C9100 и системой быстрой замены фильтров возбуждения Leica's Ultra-Fast Filter Wheels (период переключения 10–30 мс), которая позволяет обнаруживать быстрые изменения [Ca²⁺]_i. В качестве источника возбуждения использовался осветитель Leica EL6000 с ртутной лампой высокого давления HBO 103 W/2. Возбуждение и регистрацию флуоресценции Fura-2 осуществляли с помощью набора фильтров FU2 (Leica Microsystems) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15, светоделителем FT410 и фильтром эмиссии BP510/84. Изменения [Ca²⁺]_i представлены в виде соотношения 340/387, полученного из кадровых серий изображений после вычитания фона. *N* — количество клеток, проанализированных в каждом индивидуальном эксперименте, *n* — количество независимых повторов.

Индукция колебаний [Ca²⁺]_i в нейронах. В работе использовали две модели индукции регулярных высокоамплитудных колебаний [Ca²⁺]_i (кальциевых колебаний) в нейронах для изучения влияния агониста каннабиноидных рецепторов на активность нейрональных сетей. Первая модель предполагает использование конкурентного антаго-

ниста ГАМК(А)-рецепторов, бикукуллина (10 мМ). Блокирование ГАМК(А)-рецепторов приводит к гипервозбуждению нейрональных сетей. Вторая модель основана на использовании высоких доз ионов аммония. Аммоний (NH₃/NH₄⁺) является токсичным веществом и его концентрация в головном мозге может повышаться до 5 мМ при дисфункции печени [26]. Кроме того, концентрация аммония может достигать 16 мМ при абсцессах головного мозга [27]. В предыдущей работе мы показали, что концентрация 8 мМ хлорида аммония (NH₄Cl) может вызывать высокочастотные кальциевые колебания в нейронах [28]. Исходя из этого, мы использовали эту концентрацию в наших экспериментах для получения регулярных кальциевых колебаний.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для идентификации астроцитов использовали иммуноцитохимический метод. Поскольку измерения [Ca²⁺]_i и регистрацию флуоресценции антител проводили на разных микроскопах, то для совмещения изображений на обратную сторону круглого покровного стекла с культурой клеток тонким маркером наносили сетку с шагом 2 мм. В обоих микроскопах изображение сетки совмещалось с изображением перекрестия окуляра. После регистрации кальциевого сигнала клетки фотографировали в режиме фазово-контрастной микроскопии и каждую клетку нумеровали. Затем клетки фиксировали и анализировали иммуноцитохимически с использованием антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP). Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 20 мин и трижды промывали ледяным PBS в течение 5 мин. Для пермеабилзации клетки обрабатывали 0.1% раствором Тритона X-100 в течение 15 мин. Для блокирования неспецифических сайтов связывания антител фиксированные клетки инкубировали в 10% сыворотке козы в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами мыши против GFAP в течение 12 ч при 4°C (1 : 200 в 1% сыворотке козы). Фиксированные клетки затем промывали PBS (3 раза в течение 5 мин) и обрабатывали вторичными антителами козы против антител мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (1 : 200 в PBS) в соответствии с руководством производителя (Abcam, Великобритания). Для окрашивания ДНК в фиксированных клетках использовали ДНК-специфический флуоресцентный зонд Hoechst 33342. Флуоресценцию антител регистрировали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) при возбуждении HeNe-лазером с длиной волны возбуждения 633 нм и регистрации при 655–700 нм.

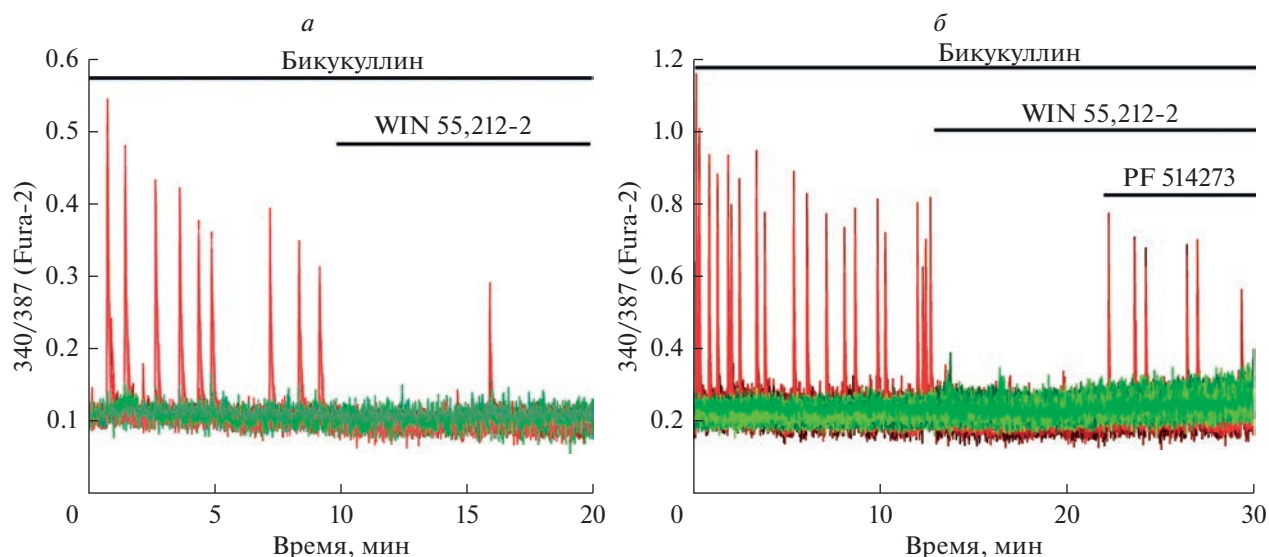


Рис. 1. *а* – Влияние агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 (1 мкМ) на индуцированные бикикуллином (10 мкМ) осцилляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в нейронах (красные кривые). ($N = 100$, $n = 4$). *б* – Антагонист CB_1 -рецепторов PF 514273 (500 нМ) отменяет действие WIN 55,212-2 (1 мкМ) на индуцированные бикикуллином кальциевые осцилляции. ($N = 100$, $n = 4$). Зеленые кривые – не отвечающие на аппликацию бикикуллина глиальные клетки.

Реагенты. В экспериментах использовались следующие реагенты: NaCl, KCl, MgSO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , глюкоза, полиэтиленгликоль, пенициллин-стрептомицин, глутамин, хлорид аммония (Sigma-Aldrich, США); среда Neurobasal-A, суплемент B-27, трипсин (1%), сыворотка козы (Life Technologies, США); Fura-2 AM, Hoechst 33342 (Molecular Probes, США); (–)-Bicuculline methochloride, WIN 55,212-2, PF 514273 (Tocris Bioscience, Великобритания); HEPES (Диаэм, Россия); антитело мыши к GFAP, антитело козы к антителам мыши (Alexa Fluor 647, Abscam, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено выше, для исследования нейротрофических свойств агониста CB -рецепторов WIN 55,212-2 в данной работе использовались модели гипервозбуждения, индуцированного бикикуллином и высокими дозами хлорида аммония. Концентрация бикикуллина во всех сериях экспериментов составляла 10 мкМ, а аммония (NH_4Cl) 8 мМ, так как оба соединения в этих концентрациях могут вызывать регулярные кальциевые колебания на определенной стадии развития нейрональной сети. Однако концентрация аммония 8 мМ считается относительно высокой и может вызывать побочные эффекты, в том числе сдвиг значения pH внутриклеточной среды в кислую сторону. Чтобы свести к минимуму влияние изменений pH, добавление WIN 55,212-2 проводили через 3 мин после добавления аммония, так

как после этого временного интервала значения внутриклеточного pH выходят на стационарный уровень [29].

На рис. 1 показано, что бикикуллин вызывает кальциевые колебания, а добавление в среду WIN 55,212-2 в концентрации от 100 нМ и выше заметно подавляет эти колебания. Полное подавление индуцированных бикикуллином осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в случае бикикуллина наблюдалось при концентрации WIN 55,212-2 ≥ 1 мкМ. В свою очередь антагонист каннабиноидных CB_1 -рецепторов PF 514273 (значения K_i 1 и >10000 нМ для CB_1 - и CB_2 -рецепторов соответственно) отменял действие WIN 55,212-2, демонстрируя, что эффект подавления осцилляций был обусловлен активацией CB_1 -рецепторов.

Из рис. 2а видно, что добавление хлорида аммония также индуцировало высокочастотные кальциевые колебания и увеличение базальной $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах. Кроме того, небольшое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ наблюдалось в группе клеток, которые методом иммуноцитохимического окрашивания были идентифицированы как астроциты (рис. 2а, зеленые стрелки; рис. 2б, белые стрелки). Следует отметить, что добавление в среду WIN 55,212-2 в концентрации ≥ 2 мкМ на фоне хлорида аммония вызывало подавление кальциевых колебаний во всех нейронах, в то время как в астроцитах (приблизительно 20% всех GFAP-положительных клеток в культуре) наблюдалось бифазное повышение базального уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

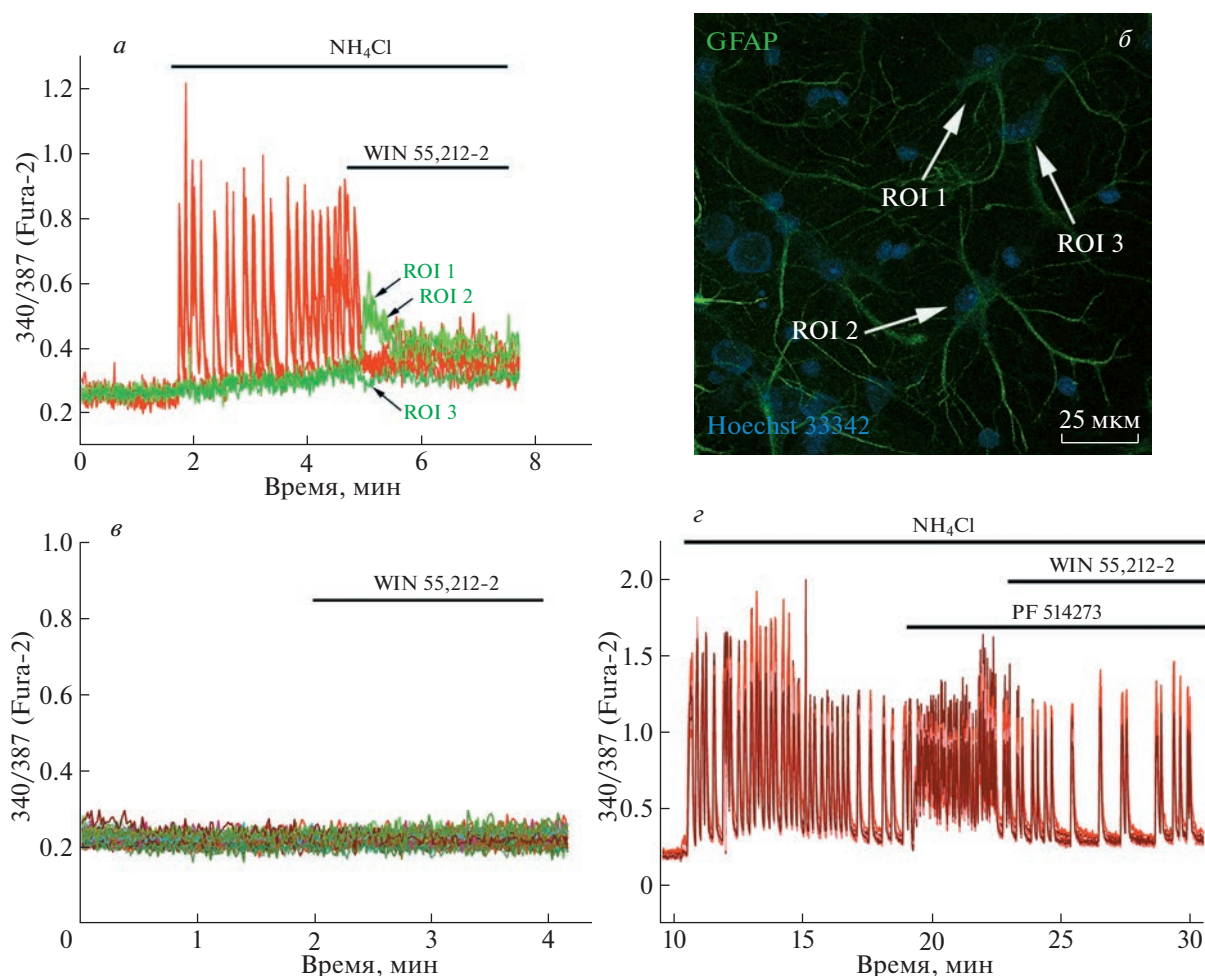


Рис. 2. *a* – Аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) подавляет индуцированные хлоридом аммония осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и вызывает импульсное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах ($N = 100, n = 5$). *б* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных культур антителами к селективному маркеру астроцитов, глияльному кислому фибриллярному белку (GFAP). Стрелками указаны астроциты, изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в которых показаны на панели *a*. Для окрашивания ядер клеток использовали краситель Hoechst 33342. *в* – Аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) в отсутствие каких-либо воздействий ($N = 100, n = 3$). *з* – Частичная отмена активирующего действия антагониста CB_1 -рецепторов PF 514273 (500 нМ) агонистом CB_1 - и CB_2 -рецепторов WIN 55,212-2 (2 мкМ). ($N = 100, n = 3$).

CB_1 - и CB_2 -рецепторы сопряжены с G_i -белком, альфа субъединица которого ингибирует аденилатциклазу и уменьшает продукцию cAMP [10, 19]. В свою очередь, как было показано ранее, в том числе и нами, бета-гамма субъединица G_i -сопряженных рецепторов может быть вовлечена в высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при участии фосфолипазы C [30–33]. Активация этого сигнального каскада может объяснить бифазный ответ астроцитов на аппликацию WIN 55,212-2, представленный на рис. 2. Интересным является тот факт, что бифазный ответ наблюдается только в случае гипервозбуждения, индуцированного хлоридом аммония, тогда как в случае бикукуллина (рис. 1) и без каких-либо воздействий (рис. 2в) астроциты не отвечают би-

фазным увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на аппликацию WIN 55,212-2. Согласно устоявшейся концепции, в условиях острой гипераммониемии аммоний проникает в клетки в первые секунды воздействия в виде молекулы аммиака (NH_3) [34], достаточно легко проходящей через липидный бислой цитоплазматической мембраны. По причине того что молекулы аммиака являются акцепторами протонов, их быстрое накопление в клетках должно сопровождаться резким повышением внутриклеточного pH. Ранее в экспериментах с острой гипераммониемией мы продемонстрировали кратковременное защелачивание внутриклеточной среды, которое затем сменялось значительным длительным закислением [29]. Причиной закисления является медленный вход NH_4^+

через ионные каналы и транспортеры. Ионы аммония, в свою очередь, являются донорами протонов, которые, высвобождаясь при диссоциации, приводят к понижению pH. Как показали наши эксперименты, закисление внутриклеточной среды в условиях гипераммониемии происходит уже через 2–3 мин воздействия аммония [29]. Добавление WIN 55,212-2 происходило спустя 3 мин воздействия хлорида аммония. Следовательно, можно предположить, что ответ астроцитов на WIN 55,212-2 в условиях гипераммониемии и его отсутствие в экспериментах без каких-либо дополнительных воздействий связано с изменениями внутриклеточного pH. Следует отметить, что для сопряженных с G-белками рецепторов показана pH-чувствительность и зависимость активируемого сигнального каскада от pH среды [35, 36]. Этот факт может свидетельствовать в пользу выдвинутого предположения.

Астроциты передают информацию, полученную от соседних клеток ЦНС, и генерируют сигналы на локальном или сетевом уровне с помощью Ca^{2+} -зависимой секреции глioneйротрансмиттеров [23, 37]. Кальциевые импульсы и волны в астроцитах рассматриваются в качестве основного способа передачи сигналов внутри астроцитарного синцития. Однако механизмы и последствия астроцитарной Ca^{2+} -сигналикации все еще недостаточно изучены. Эндоканнабиноиды, активируя внутриклеточные Ca^{2+} -сигнальные каскады, вовлекают астроциты в модуляцию синаптической пластичности [38]. Ранее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах в ответ на добавление WIN 55,212-2 было показано для астроцитов супрахиазматического ядра. Этот эффект, как сообщают авторы, опосредован активацией CB_1 -рецепторов [39]. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в астроцитах может приводить к секреции различных глioneйротрансмиттеров, включая глутамат, АТР и ГАМК [23]. Как было показано ранее, Ca^{2+} -зависимая секреция ГАМК астроцитами может объяснить подавление агонистами α_2 -адренергических рецепторов индуцированных аммонием колебаний [30]. Можно предположить, что подавление колебаний WIN 55,212-2 (рис. 2) также происходит за счет ГАМК, секретруемого астроцитами. Однако ингибирующее действие WIN 55,212-2 связано не только с астроцитами. Подавление колебаний, индуцированных бикикуллином, по всей видимости, связано с действием WIN 55,212-2 на нейрональные рецепторы.

Чтобы выявить возможное участие CB_2 -рецепторов в регуляции активности нейрональной сети при действии хлорида аммония, агонист CB_1 -/ CB_2 -рецепторов WIN 55,212-2 добавляли на фоне селективного антагониста CB_1 -рецепторов PF 514273. PF 514273 в избыточной концен-

трации ≥ 200 нМ, существенно увеличивал частоту осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и повышал базальный уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2e), что указывает на резидентную роль CB_1 -рецепторов в торможении сети нейронов при аппликации хлорида аммония. Концентрация 200 нМ также в 50 раз меньше его K_i к CB_2 -рецептору, что практически исключает воздействие на этот рецептор. Дальнейшая аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) привела к уменьшению частоты осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и понижению базального уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В сумме эти факты указывают на участие и CB_2 -рецепторов в торможении активности сети нейронов при гипервозбуждении, индуцированном хлоридом аммония. Следует отметить, что активация CB_2 -рецепторов не прекращает колебания, но понижает уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Научные открытия в области исследования каннабиноидов продемонстрировали, что, действуя через CB_1 - и CB_2 -рецепторы, они облегчают симптомы, связанные с гипервозбуждением нейронов в сети. В моделях рассеянного склероза и болезни Гентингтона активация CB_1 -рецепторов значительно снижала спазм и тремор, а экзогенное применение агониста каннабиноидных рецепторов 2-арахидоноилглицерина (2-AG) оказывало нейропротекторное действие после черепно-мозговой травмы [6, 7, 40]. Кроме того, в *in vitro* и *in vivo* исследованиях ишемии каннабиноиды значительно снижали эксайтотоксическую гибель нейрональных клеток, вызванную избыточной секрецией глутамата. Считается, что эти эффекты каннабиноидов связаны с подавлением секреции этого нейротрансмиттера за счет ингибирования активности пресинаптических потенциал-зависимых кальциевых каналов [41]. На молекулярном уровне противосудорожный механизм действия каннабиноидов все еще недостаточно изучен. Модуляция высвобождения нейротрансмиттеров за счет активации пресинаптических CB_1 -рецепторов может рассматриваться в качестве одного из механизмов противосудорожных свойств каннабиноидов. Известно, что активация CB_1 -рецептора уменьшает вход ионов кальция через N- и P/Q-типы Ca^{2+} -каналов, результатом чего является снижение Ca^{2+} -зависимого высвобождения глутамата [42], при этом не исключается влияние на секрецию ГАМК. Хотя глутамат имеет ключевое значение для нормальной нейротрансмиссии, повышение его уровня в межклеточном пространстве приводит к эксайтотоксичности. Поэтому для снижения высвобождения данного нейромедиатора можно использовать каннабиноиды. Активация CB_1 -рецептора также увеличивает проводимость пре- и постсинаптических K^+ -каналов [43]. Повышенная проницаемость K^+ -каналов приводит к снижению мембранного потенциала (гиперполяризации),

что способствует подавлению эпилептиформной активности.

Было также показано, что активация CB₁-рецепторов в ГАМКергических нейронах ослабляет процессы торможения глутаматергических нейронов в гиппокампе за счет ретроградного действия эндогенных каннабиноидов, высвобождающихся при деполяризации последних. При этом происходит растормаживание постсинаптического нейрона и, следовательно, облегчение передачи возбуждения [44]. Кроме того, Cohen и коллеги продемонстрировали, что ГАМК, которая обычно является ингибирующим нейромедиатором, может в некоторых случаях усиливать возбуждение, синхронизуя аномальные разряды, возникающие при эпилепсии в срезах височной доли мозга человека [45]. Несмотря на то, что механизм этого явления не ясен, наиболее вероятное объяснение противосудорожного действия каннабиноидов при эпилепсии заключается в возможности CB₁-рецепторов вызывать компенсаторный сдвиг в балансе между ингибированием пресинаптического высвобождения глутамата и ГАМК.

Психоактивные побочные эффекты каннабиноидов усложняют их использование в лечении нейродегенеративных заболеваний, однако понимание молекулярных механизмов действия каннабиноидов может привести к разработке новых соединений, которые не влияют на поведенческую активность. Таким образом, дальнейшее исследование каннабиноидного противосудорожного феномена может пролить свет на новые терапевтические мишени для лечения различных нейродегенеративных нарушений, сопровождаемых гипервозбуждением, а также более четко определить физиологическую функцию, механизмы и сигнальные пути эндоканнабиноидной системы в головном мозге.

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

Источники финансирования. Работа выполнялась в рамках государственного задания ИБК РАН, № 122041300005-4 “Функционирование рецепторов, ионных каналов и внутриклеточных сигнальных систем, механизмы межклеточных коммуникаций в различных типах клеток в норме и при патологиях. Поиск потенциальных мишеней для фармакотерапии”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vossel K.A., Tartaglia M.C., Nygaard H.B., Zeman A.Z., Miller B.L. 2017. Epileptic activity in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*. **16** (4), 311–322.
2. Chai Z., Ma C., Jin X. 2019. Homeostatic activity regulation as a mechanism underlying the effect of brain stimulation. *Bioelectron Med*. **5**, 16.
3. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Zinchenko V.P. 2017. Cytokine IL-10, activators of PI3-kinase, agonists of α -2 adrenoreceptor and antioxidants prevent ischemia-induced cell death in rat hippocampal cultures. *Archives Biochem. Biophys.* **615** (1), 35–43.
4. Finnerup N.B., Attal N., Haroutounian S., McNicol E., Baron R., Dworkin R.H., Gilron I., Haanpää M., Hansson P., Jensen T.S., Kamerman P.R., Lund K., Moore A., Raja S.N., Rice A.S.C., Rowbotham M., Sena E., Siddall P., Smith B.H., Wallace M. 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults. *Lancet Neurology*. **14** (2), 162–173.
5. Yoo J.Y., Panov F. 2019. Identification and treatment of drug-resistant epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. **25** (2), 362–380.
6. Wu J. 2019. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system. *Acta Pharmacol. Sin.* **40** (3), 297–299.
7. Montero-Oleas N., Arevalo-Rodriguez I., Nuñez-González S., Viteri-García A., Simancas-Racines D. 2020. Therapeutic use of cannabis and cannabinoids: An evidence mapping and appraisal of systematic reviews. *BMC Complement. Med. Ther.* **20** (1), 2456.
8. Kow R.L., Jiang K., Naydenov A.V., Le J.H., Stella N., Nathanson N.M. 2014. Modulation of pilocarpine-induced seizures by cannabinoid receptor 1. *PLoS One*. **9** (4), e95922.
9. Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S.C., Cascio M.G., Gutiérrez S.O., van der Stelt M., López-Rodríguez M.L., Casanova E., Schütz G., Zieglgänsberger W., Di Marzo V., Behl C., Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. **302** (5642), 84–88.
10. Zou S., Kumar U. 2018. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (3), 833.
11. Sagredo O., González S., Aroyo I., Pazos M.R., Benito C., Lastres-Becker I., Romero J.P., Tolón R.M., Mechoulam R., Brouillet E., Romero J., Fernández-Ruiz J. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity. *Glia*. **57** (11), 1154–1167.
12. Chen D.-J., Gao M., Gao F.-F., Su Q.-X., Wu J. 2017. Brain cannabinoid receptor 2. *Acta Pharmacol. Sin.* **38** (3), 312–316.
13. Stempel A.V., Stumpf A., Zhang H.-Y., Özdoğan T., Pannasch U., Theis A.-K., Otte D.-M., Wojtalla A., Rácz I., Ponomarenko A., Xi Z.-X., Zimmer A., Schmitz D. 2016. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus. *Neuron*. **90** (4), 795–809.

14. Stumpf A., Parthier D., Sammons R.P., Stempel A.V., Breustedt J., Rost B.R., Schmitz D. 2018. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific self-inhibition in cortical neurons. *Neuropharmacology*. **139**, 217–225.
15. Ma Z., Gao F., Larsen B., Gao M., Luo Z., Chen D., Ma X., Qiu S., Zhou Y., Xie J., Xi Z.-X., Wu J. 2019. Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *EBioMedicine*. **42**, 225–237.
16. Mason R., Cheer J.F. 2009. Cannabinoid receptor activation reverses kainate-induced synchronized population burst firing in rat hippocampus. *Front. Integr. Neurosci.* **3**, 13.
17. Milano W., Capasso A. 2018. Neuroprotection by cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Alzheimers Dement. Cogn. Neurol.* **2** (1), 1–7.
18. Casillas-Espinosa P.M., Ali I., O'Brien T.J. 2020. Neurodegenerative pathways as targets for acquired epilepsy therapy development. *Epilepsia Open*. **5** (2), 138–154.
19. Kendall D.A., Yudowski G.A. 2017. Cannabinoid receptors in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 9790.
20. Mitchell V.A., Jeong H.-J., Drew G.M., Vaughan C.W. 2011. Cholecystokinin exerts an effect via the endocannabinoid system to inhibit GABAergic transmission in midbrain periaqueductal gray. *Neuropsychopharmacology*. **36** (9), 1801–1810.
21. Sánchez-Blázquez P., Rodríguez-Muñoz M., Garzón J. 2014. The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction. *Front. Pharmacol.* **4**, 169.
22. Navarrete M., Araque A. 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. **57** (6), 883–893.
23. Bazargani N., Attwell D. 2016. Astrocyte calcium signaling. *Nat. Neurosci.* **19** (2), 182–189.
24. Navarrete M., Araque A. 2010. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*. **68** (1), 113–126.
25. Hryhorowicz S., Kaczmarek-Ryś M., Andrzejewska A., Staszak K., Hryhorowicz M., Korcz A., Słomski R. 2019. Allosteric modulation of cannabinoid receptor 1-current challenges and future opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (23), 5874.
26. Bosoi C.R., Rose C.F. 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab. Brain Dis.* **24** (1), 95–102.
27. Dahlberg D., Ivanovic J., Hassel B. 2016. Toxic levels of ammonia in human brain abscess. *J. Neurosurg.* **124** (3), 854–860.
28. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Tankanag A.V., Zinchenko V.P., Abulseoud O.A. 2015. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? *PLoS ONE*. **10** (7), e0134145.
29. Gaidin S.G., Zinchenko V.P., Kosenkov A.M. 2020. Mechanisms of ammonium-induced neurotoxicity. Neuroprotective effect of alpha-2 adrenergic agonists. *Archives Biochem. Biophys.* **693**, 108593.
30. Gaidin S.G., Zinchenko V.P., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Mal'tseva V.N., Kosenkov A.M. 2020. Activation of alpha-2 adrenergic receptors stimulates GABA release by astrocytes. *Glia*. **68** (6), 1114–1130.
31. Zhu X., Birnbaumer L. 1996. G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93** (7), 2827–2831.
32. Madukwe J.C., Garland-Kuntz E.E., Lyon A.M., Smrcka A.V. 2018. G protein $\beta\gamma$ subunits directly interact with and activate phospholipase C ϵ . *J. Biol. Chem.* **293** (17), 6387–6397.
33. Enkvist M.O., Hämäläinen H., Jansson C.C., Kukkonen J.P., Hautala R., Courtney M.J., Akerman K.E. 1996. Coupling of astroglial alpha 2-adrenoreceptors to second messenger pathways. *J. Neurochem.* **66** (6), 2394–2401.
34. Ott P., Vilstrup H. 2014. Cerebral effects of ammonia in liver disease. *Metab. Brain Dis.* **29** (4), 901–911.
35. Huang Y., Thathiah A. 2015. Regulation of neuronal communication by G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **589** (14), 1607–1619.
36. Wang T., Zhou G., He M., Xu Y., Rusyniak W.G., Xu Y., Ji Y., Simon R.P., Xiong Z.-G., Zha X.-M. 2020. GPR68 is a neuroprotective proton receptor in brain ischemia. *Stroke*. **51** (12), 3690–3700.
37. Poskanzer K.E., Yuste R. 2016. Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113** (19), E2675–84.
38. Bindocci E., Savtchouk I., Liaudet N., Becker D., Carriero G., Volterra A. 2017. Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*. **356** (6339), eaai8185.
39. Hablitz L.M., Gunesch A.N., Cravetich O., Moldavan M., Allen C.N. 2020. Cannabinoid signaling recruits astrocytes to modulate presynaptic function in the suprachiasmatic nucleus. *eNeuro*. **7** (1), ENEURO.0081-19.2020.
40. Abo Youssef N., Schneider M.P., Mordasini L., Ineichen B.V., Bachmann L.M., Chartier-Kastler E., Panicker J.N., Kessler T.M. 2017. Cannabinoids for treating neurogenic lower urinary tract dysfunction in patients with multiple sclerosis. *B.J.U. Int.* **119** (4), 515–521.
41. Abood M.E., Rizvi G., Sallapudi N., McAllister S.D. 2001. Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* **309** (3), 197–201.
42. Twitchell W., Brown S., Mackie K. 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **78** (1), 43–50.
43. Ohno-Shosaku T., Kano M. 2014. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Current Opinion Neurobiol.* **29**, 1–8.
44. Monory K., Polack M., Remus A., Lutz B., Korte M. 2015. Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **35** (9), 3842–3850.
45. Cohen I., Navarro V., Clemenceau S., Baulac M., Miles R. 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*. **298** (5597), 1418–1421.

Activation of the Cannabinoid Receptors Suppresses Hyperexcitation of Rat Hippocampal Neuronal Networks *in vitro*

S. A. Maiorov¹, B. K. Kairat², S. G. Gaidin¹, A. M. Kosenkov¹, V. P. Zinchenko¹, *

¹*Institute of Cell Biophysics RAS, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

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

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

Cannabinoid receptors (CBRs) play a key role in various physiological processes, including neurogenesis, synaptic plasticity, immune modulation, cell apoptosis, metabolism regulation, cardiovascular and reproductive systems activity. Since activation of CBRs suppresses hyperexcitation and protect cells from death, their modulation may have therapeutic prospects in the treatment of such pathologies of the nervous system as mental disorders, epilepsy, Parkinson's and Huntington's disease, multiple sclerosis, spinal cord and brain injuries. This paper presents experimental data on the effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on the induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in two *in vitro* models of epileptiform activity. To study the neuroprotective properties of WIN 55,212-2, hyperexcitation was induced by the application of a GABA(A) receptor antagonist, bicuculline, or depolarizing doses of ammonium chloride. As experiments have shown, WIN 55,212-2 at a concentration of 100 nM and above significantly suppresses the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillation frequency and reduces the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level. At the same time, the amplitude of calcium oscillations also decreased in the presence of the agonist. WIN 55,212-2 at a concentration of 5 μM suppressed NH_4Cl -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in all neurons but caused a transient biphasic increase in the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in 20% of astrocytes. Thus, in this work, using various models of hyperexcitation of neuronal networks, we have demonstrated the potential antiepileptic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2.

Keywords: cannabinoid receptors, cell calcium, astrocytes, neurons, hyperexcitation of the neuronal networks

УДК 577.112.345

СМЕШАННЫЕ КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ L-АМИНОКИСЛОТ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ

© 2023 г. З. Г. Дениева^a, *, О. О. Колоскова^b, А. М. Гилева^c,
У. А. Буданова^d, Ю. Л. Себякин^d

^aИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Москва, 119071 Россия

^bГНЦ Институт иммунологии ФМБА России,
Москва, 115522 Россия

^cИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

^dМИРЭА – Российский технологический университет
(Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова),
Москва, 119571 Россия

*e-mail: zaret03@mail.ru

Поступила в редакцию 27.09.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 16.01.2023 г.

Данная работа направлена на получение смешанных липосом на основе природных аминокислот как средств доставки противоопухолевых препаратов и нуклеиновых кислот. Липосомы сформированы из катионных липидов на основе *L*-аланина и *L*-серина, керасомообразующего липида на основе *L*-орнитина, а также фосфолипидов (фосфатидилхолина (PC) или 1,2-ди-*O*-олеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE)). Для разработанных транспортных систем определены размер частиц, дзета-потенциал, стабильность и изучена биологическая активность на линиях клеток MCF-7 и НЕК 293. Липосомы на основе *L*-серина демонстрируют способность аккумулироваться в эндоплазматическом ретикулуме клеток в течение 1 ч, а также трансфекционную активность, значительно превышающую активность коммерческого препарата Lipofectamine-2000. Предложенная система обладает небольшим токсическим эффектом (IC₅₀ составляет 0.475 мг/мл, а безопасная рабочая концентрация – 0.24 мг/мл).

Ключевые слова: катионные амфифилы, керасомообразующие липиды, производные аминокислот, адресная доставка, противоопухолевые агенты

DOI: 10.31857/S0233475523030052, EDN: FDQFOC

ВВЕДЕНИЕ

Липосомы являются широко известными невирусными системами доставки терапевтических молекул в живые клетки-мишени. Впервые о липосомах заговорили в 1960-е годы, после чего их стали широко применять для адресной до-

ставки малых лекарственных молекул, белков, нуклеиновых кислот и др. как в фундаментальных исследованиях, так и в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [1].

Существует несколько способов получения липосом. В зависимости от выбранной методики можно сформировать везикулы разных размеров и ламеллярности [2]. Размеры липосом могут составлять 20–200 нм (для мелких везикул), от 200 нм до 1 мкм (для крупных) и более 1 мкм (для гигантских везикул) [3]. Последние также могут существовать в виде многослойных везикул, состоящих из множества липидных бислоев. В медицинских целях наиболее часто применяют метод гидратирования тонкой липидной пленки с последующей обработкой ультразвуком для получения моноламеллярных везикул малого размера [4].

Сокращения: Вос₂O – ди-*трет*-бутилкарбонат; DCC – дициклогексилкарбодиимид; DOPC – 1,2-ди-*O*-олеоилфосфатидилхолин; DOPE – 1,2-ди-*O*-олеоилфосфатидилэтаноламин; DOX – доксорубин; DPPC – 1,2-ди-*O*-пальмитоилфосфатидилхолин; NOVt – 1-гидроксibenзотриазол; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; PBS – физиологический раствор на фосфатном буфере; PC – фосфатидилхолин; POPC – 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин; TFA – трифторуксусная кислота; ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс; КЛ – катионные липиды; КОЛ – керасомообразующие липиды; КПУ – критический параметр упаковки; ТСХ – тонкослойная хроматография; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

Коммерческие наборы липосом в основном состоят из различных типов синтетических амфифилов и фосфолипидов. Однако они могут быть нестабильными в средах, содержащих сыворотку, необходимую для роста клеток [5]. Например, общеизвестным реагентом для доставки нуклеиновых кислот (трансфекции) является Lipofectamine 2000 (Lf-2000). Комплексное исследование токсикологического влияния Lf-2000 на эукариотические клетки, в ходе которого клеточную линию HeLa обрабатывали различными концентрациями комплекса плазмидной ДНК (пДНК)/Lipofectamine 2000 в течение суток, показало гибель до 55% клеток HeLa [6].

Необходимость создания менее токсичных липосом для целей медицины привела к использованию химических подходов, которые позволяют смягчить нежелательные цитотоксические эффекты и увеличивают эффективность доставки терапевтических молекул в клетки [5]. Они включают варьирование структуры липидов, создание катионных и керасомообразующих липидов [7, 8], а также их комбинирование с фосфолипидами. Подобная стратегия является шагом на пути к более безопасной “Green Chemistry” [9]. Катионные липиды в составе липосом облегчают проникновение липосом внутрь клетки за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными липосомами и отрицательно заряженной поверхностью клеточных мембран [10]. Использование керасомообразующих липидов позволяет преодолеть низкую стабильность липосом — основной недостаток везикул на основе природных липидов [11]. Керасомообразующие липиды образуют на поверхности везикулы прочную сеть —Si—O—Si—, которая резко увеличивает устойчивость агрегатов по сравнению с обычными липосомами [12]. Введение в систему дополнительных липидов-хелперов (DOPE, DOPC, DPPC или холестерина) может увеличить эффективность липосом для решения конкретной задачи [13]. Для разных целей можно применять различные липиды, например, для увеличения эффективности трансфекции чаще всего используют DOPE [14–16], а для облегчения процесса проникновения в клетку — фосфатидилхолин [17].

Таким образом, целью данной работы было создание и изучение биологической активности смешанных липосом на основе катионных и керасомообразующих липидов, а также фосфолипидов как средств доставки противоопухолевых препаратов и нуклеиновых кислот. Амфифилы были синтезированы на основе природных *L*-аминокислот. Присутствие различных функциональных групп в аминокислотах дает возможность синтезировать большое разнообразие молекул для формирования липосомальных агрегатов различной морфологии [18–20]. Кроме того, природные *L*-аминокислоты могут способствовать

биоразлагаемости молекул [21, 22]. В качестве катионных липидов были выбраны синтезированные нами ранее амфифилы на основе *L*-аланина и *L*-серина [23]. Для стабилизации транспортной системы была предложена оригинальная схема и синтезирован новый керасомообразующий липид на основе *L*-орнитина. В качестве фосфолипидов были выбраны фосфатидилхолин для доставки противоопухолевого препарата доксорубицина и DOPE для трансфекции. Исследованы физико-химические свойства смешанных липосом и изучена их биологическая активность в экспериментах *in vitro*. Результаты экспериментов показали перспективность использования средств доставки на основе *L*-серина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все химические вещества и реагенты коммерчески доступны и использовались без дополнительной очистки: Voc_2O (Sigma Aldrich), DCC (Sigma Aldrich), HOBT (Sigma Aldrich), *L*-орнитин моногидрохлорид (Sigma Aldrich), олеиламин ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NH}_2$) (Sigma Aldrich), 3-(триэтоксисил)пропилизотиоцианат (Sigma Aldrich), NaHCO_3 (Химмед, Россия), Na_2SO_4 безводный (Химмед, Россия), NaCl (Химмед, Россия), NaOH (Химмед, Россия), лимонная кислота (Химмед, Россия), TFA (Biochem, Франция), Triton X-100, DOPE (Avanti Polar Lipids, США), PC (Avanti Polar Lipids, США).

^1H -ЯМР-спектры регистрировали в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) на ЯМР-спектрометре “Bruker WM-300” с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре “Bruker—EQUINOX 55”.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Сорбфил (Краснодар, Россия). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Merck 0.040–0.063 мм (Германия). Обнаружение пятен веществ по ТСХ осуществляли нагреванием над пламенем спиртовки. Содержание двойной связи обнаруживали водным раствором KMnO_4 . Вещества, содержащие свободную аминогруппу, обнаруживали 5%-ным раствором нингидрина с последующим нагреванием до 55–75°C.

$\text{N}_\alpha, \text{N}_\delta$ -бис(трет-бутоксикарбонил)-*L*-орнитин (1). К раствору 1 г (5.92 ммоль) *L*-Orn·HCl в 10 мл 4 М водного раствора NaOH прикапывали в течение 1 ч раствор 5.18 г (23.7 ммоль) Voc_2O в 30 мл тетрагидрофурана, поддерживая pH 9–10 дополнительным количеством 4 М раствора NaOH, и перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Контроль реакции осуществляли по данным ТСХ в системе $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ 1 : 1 (об/об). После окончания реакции растворитель удаляли в вакууме, вещество разбавляли водой,

насыщали хлоридом натрия, подкисляли 10%-ным раствором лимонной кислоты до pH 3, экстрагировали этилацетатом и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель упаривали на ротормном испарителе. Маслообразное вещество кристаллизовали гексаном. Получали 1.57 г (79.7%) продукта **1**. R_f 0.85. ИК-спектр (KBr), $\nu/\text{см}^{-1}$: 3354 (N-H, COO-H); 2975, 2933, 721 (C-H); 1697 (C=O, амид I); 1522 (N-C=O амид II); 1368, 1251 (C-O); 1171 (C-N).

N_α, N_δ -бис-(трет-бутоксикарбонил)-L-орнитил-9-октадецениламид (2). К охлажденному до 0°C раствору 0.3 г (0.90 ммоль) соединения **1** в 4 мл безводного CH_2Cl_2 при перемешивании последовательно добавляли 0.24 г (1.8 ммоль) НОВт, раствор 0.37 г (1.8 ммоль) DCC в 5 мл безводного CH_2Cl_2 и 0.36 г (1.4 ммоль) олеиламина в 5 мл безводного CH_2Cl_2 . Смесь выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 24 ч. Контроль протекания реакции осуществляли по данным ТСХ в системе CHCl_3 : MeOH 20 : 1 (об/об). После завершения реакции выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровали. Продукт выделяли колоночной хроматографией в системе CCl_4 : MeOH 10 : 1 (об/об). Получали 0.52 г (99.4%) соединения **2**. R_f 0.86 (CHCl_3 : MeOH 9 : 1 (об/об)). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.82 (т, 3 Н, CH_2CH_3); 1.22 (м, 22 Н, CH_2); 1.24 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.37 (с, 18 Н, CCH_3); 1.50 (м, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 1.69 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.90 (д.д., 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$); 3.02 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.15 (м, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 4.16 (с, 1 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.91 (т, 1 Н, $\delta\text{-NH}$); 5.28 (т.д., 2 Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$, $J = 6.1, 5.5, 3.3$); 5.41 (д, 1 Н, $\alpha\text{-NH}$); 6.75 (с, 1 Н, C(O)NH).

L-орнитил-9-октадецениламид (3). К охлажденному до 0°C 0.52 г (0.89 ммоль) соединения **2** в 20 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли раствор 20 мл TFA в CH_2Cl_2 (1 : 1 об/об) и перемешивали в течение 1 ч при 0°C. За ходом реакции следили по данным ТСХ в системе CHCl_3 : MeOH 9 : 1 (об/об). После завершения реакции растворитель с TFA отгоняли в вакууме с получением трифторацетатной соли в виде масла. Далее технический продукт растворяли в 30 мл CHCl_3 , последовательно промывали 10%-ным NaHCO_3 (3 $\times$ 30 мл) и водой до pH 7, сушили над Na_2SO_4 , растворитель отгоняли на ротормном испарителе. Выход продукта **3** составил 0.33 г (96.0%). R_f 0.09 (CHCl_3 : MeOH 9 : 1 (об/об)). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (т, 3 Н, CH_2CH_3); 1.25 (м, 22 Н, CH_2); 1.50 (м, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 1.70 (м, 4 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.99 (д.д., 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$); 2.73 (т, 1 Н, C(O)NH); 3.22 (т, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 3.42 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.12 (д, 1 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 5.34 (т.д., 2 Н,

$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$, $J = 6.2, 5.5, 3.4$); 7.20 (д, 2 Н, $\alpha\text{-NH}$); 8.12 (т, 2 Н, $\delta\text{-NH}$).

N_α, N_δ -бис-[(3-триэтоксисилил)пропилизотиоцианат]-L-орнитил-9-октадецениламид (4). К раствору 0.3 г (0.79 ммоль) соединения **3** в 25 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли по каплям в течение 30 мин при перемешивании 0.43 г (1.73 ммоль) (3-триэтоксисилил)пропилизотиоцианата. Смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Контроль реакции осуществляли по данным ТСХ в системе CHCl_3 : MeOH 20 : 1 (об/об). После окончания реакции растворитель упаривали, технический продукт последовательно промывали метанолом (1 $\times$ 10 мл) и гексаном (2 $\times$ 10 мл). Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе CCl_4 : MeOH 25 : 1 (об/об). Получали 0.93 г (91.0%) вещества **4**. R_f 0.47 (CHCl_3 : MeOH 20 : 1 (об/об)). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.62 (т, 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 0.87 (т, 3 Н, CH_2CH_3); 1.19-1.36 (м, 40 Н, CH_2CH_3 , OCH_2CH_3); 1.56 (м, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 1.61 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.64 (м, 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 1.71 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.94 (м, 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$); 3.14 (м, 2 Н, $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2$); 3.18 (м, 2 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.47 (с, 2 Н, $\alpha\text{-NH}\text{C(O)NH}$); 3.54 (с, 2 Н, $\delta\text{-NH}\text{C(O)NH}$); 3.65 (с, 4 Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 3.80-3.82 (м, 12 Н, OCH_2CH_3); 4.14 (д, 1 Н, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.91 (с, 1 Н, C(O)NH); 5.33 (м, 2 Н, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$).

Приготовление липосомальных дисперсий. На веску липидов, достаточную для создания концентрации 2 мг/мл, растворяли в 2 мл хлороформа и упаривали на ротормном испарителе при 30 об/мин и температуре 35°C до образования тонкой пленки. Пленку сушили в вакууме в течение 3-4 ч и затем гидратировали дистиллированной водой в течение 30 мин при медленном перемешивании. Смоченную пленку обрабатывали ультразвуком в течение 50 мин при температуре 40°C.

Средний размер частиц и дзета-потенциал. Распределение частиц по размерам оценивали методом фотонно-корреляционной спектроскопии, основанным на принципах динамического светорассеяния. При определении дзета-потенциала раствор разбавляли водой при 25°C. Измерения проводили на приборе типа "Zetasizer Nano ZS" (Malvern Panalytical, UK).

Стабильность при хранении. Стабильность липосомальных дисперсий при хранении при комнатной температуре оценивали по изменению значений показателя оптической плотности при длине световой волны 400 нм в течение двух-трех недель. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Стабильность к действию детергента Triton X-100. Устойчивость к действию ПАВ определяли двумя методами.

1. По изменению значений показателя оптической плотности дисперсий при добавлении детергента.

К липосомам добавляли рассчитанное количество Triton X-100, инкубировали смеси при перемешивании в течение 10 мин и проводили измерения оптической плотности при длине волны 400 нм. Для сравнения использовали липосомы на основе фосфатидилхолина.

2. По количеству вытекшей флуоресцентной краски из липосом.

Липосомы загружали водорастворимым красителем кальцеином на этапе гидратирования тонкой пленки. В качестве буфера для приготовления липосом использовали раствор, содержащий 270 мМ сахарозы, 2 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 4 мМ кальцеина, pH 7.0. Полученную дисперсию очищали от избытка красителя методом колоночной хроматографии (Sephadex G-100, superfine), элюируя фосфатным буфером (PBS) с pH 7.0. Эксперименты проводили в изоосмотических условиях (335 ± 6 мОсм).

Количество вытекшей краски (%) в результате действия на липосомы детергента Triton X-100 рассчитывали по формуле:

$$\text{выход}(\%) = \frac{I_m - I_0}{I_{100} - I_0} \times 100\%,$$

где I_m — измеряемая интенсивность флуоресценции липосомы; I_0 и I_{100} — интенсивность флуоресценции в начальный момент и после добавления Triton X-100 соответственно.

Встраивание доксорубина. Липосомы из смеси КЛ : РС (1 : 1) загружали доксорубином на этапе получения тонкой липидной пленки. Навеску доксорубина (из расчета 400 мкг DOX на 1 мг липидов) растворяли в дистиллированной воде. Данным раствором гидратировали липидную пленку и подвергали ультразвуковой обработке в течение 50 мин при 40°C.

Не включившийся в везикулы препарат удаляли диализом в диализных мешках фирмы ELKAY Products, Inc., Type C с размером пор до 10 кДа в течение 3–6 ч. За ходом процесса следили по прекращению изменения показателя оптической плотности водной среды, окружающей диализный мешок. Измерения проводили в видимой области спектра поглощения DOX при длине световой волны 470 нм.

Включение препарата в липосомы (X , %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D_1}{D} \times 100\%,$$

где D_1 — оптическая плотность липосомальной дисперсии после диализа; D — оптическая плотность раствора исходной дисперсии.

Токсичность. Исследование цитотоксичности частиц проводили на линии клеток человеческой аденокарциномы молочной железы MCF-7 по данным МТТ-теста. Исследовали эффекты “пустых” и загруженных доксорубином смешанных липосом на основе КЛ : РС 1 : 1. В качестве объекта сравнения использовали DOX без липосом. Клетки MCF-7 рассаживали по 7500 клеток в лунку в 96-луночный планшет. Результаты теста снимали через 48 ч.

Накопление частиц в клетках. Исследование накопления частиц в клетках проводили на линии клеток MCF-7. В качестве исследуемых дисперсий использовали смешанные липосомы на основе КЛ : РС 1 : 1, загруженные DOX.

Анализ распределения транспортных систем в клетке проводили с помощью конфокальной микроскопии. Эффективность накопления и локализация липосом в клетках была исследована с помощью конфокального лазерного микроскопа (Nikon TE-2000, Япония). Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (40 тыс. клеток на стекло) высевали на покровные стекла в питательной среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) и оставляли в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37°C) на 24 ч. Для визуализации ядер старую среду заменяли свежей средой DMEM, содержащей краситель Hoechst 33258 (50 мкМ) и инкубировали клетки в течение 15 мин. Избыток красителя затем трижды отмывали физиологическим раствором на фосфатном буфере (pH 7.4), добавляли к клеткам дисперсию липосом в среде DMEM (0.5 мкл на 1 мл среды) и переносили в CO₂-инкубатор на 15 мин и 1 ч. Несвязанные частицы удаляли трехкратной промывкой PBS. Затем клетки фиксировали на покровных стеклах с помощью CC/Mount fluorophor protector и изучали с помощью конфокального микроскопа. Длина волны возбуждающего света 470 и 360 нм, эмиссии флуоресценции — 560–650 и 380–460 нм для доксорубина и Hoechst 33258 соответственно.

Трансфекция. Трансфекцию проводили на линии клеток эмбриональной почки человека HEK 293 в 48-луночном планшете. В качестве исследуемых дисперсий использовали катионные липосомы и смешанные липосомы на основе КЛ : DOPE 1 : 1. Клетки засевали в планшет в количестве 70 тыс. клеток на лунку в 300 мкл питательной среды DMEM и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч до достижения монослоя. Дисперсию трансфекционного агента (смесь липосом и плазмидной ДНК) общим объемом 80 мкл готовили в бессывороточной среде OPTIMEM (соотношение N : P — 16 : 1). В каче-

стве положительного контроля использовали коммерческий трансфекционный агент Lipofectamine-2000. В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pGL3. Приготовленные смеси выдерживали 30 мин при комнатной температуре, наносили на монослой клеток и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение суток. Далее методом люциферазного теста определяли активность люциферазы.

Люциферазный тест проводили с использованием коммерческого набора “Luciferase Assay System” (Promega, США). Для этого ростовую среду удаляли из лунок и добавляли 70 мкл лизирующего буфера “Glo lysis byffer 1x” (США). Клетки выдерживали 20 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C для достижения полного лизиса. Затем клеточную суспензию отбирали со дна лунок и переносили в пробирки типа errendorf. Полученный лизат центрифугировали в течение 3 мин при скорости 10000 об/мин, отбирали по 50 мкл супернатанта и добавляли люциферазный субстрат в соотношении 1 : 1. Эффективность трансфекции оценивали по уровню люминесценции на приборе Glo-Max 20/20 luminometer (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что липосомальные транспортные системы доставки терапевтических молекул позволяют снизить общую токсичность переноси-

мых веществ для организма и увеличить избирательность их накопления в клетках-мишенях. Важную роль в положительной динамике действия липосом играет их стабильность в системном кровотоке. Для ее обеспечения в систему можно вводить керасомообразующие липиды, которые за счет силоксановой сети на поверхности везикул способствуют увеличению стабильности, при этом не вызывая новых токсических эффектов [11]. Для применения липосом под конкретные цели целесообразно вводить в систему липиды-хелперы, например PC или DOPE [14–17]. Также для облегчения проникновения липосом в клетки-мишени применяют катионные липосомы [10].

В данной работе разработаны комплексные платформы адресной доставки нуклеиновых кислот и противоопухолевых препаратов на основе катионных липидов, керасомообразующих липидов и липидов-хелперов и проверена их эффективность в экспериментах *in vitro*. Предложена оригинальная схема и осуществлен синтез нового бивалентного керасомообразующего липида на основе L-орнитина для стабилизации платформы (схема 1). Использование аминокислот позволяет получать амфифилы простыми методами пептидной химии и предполагает снижение возможных токсических эффектов благодаря природным компонентам.

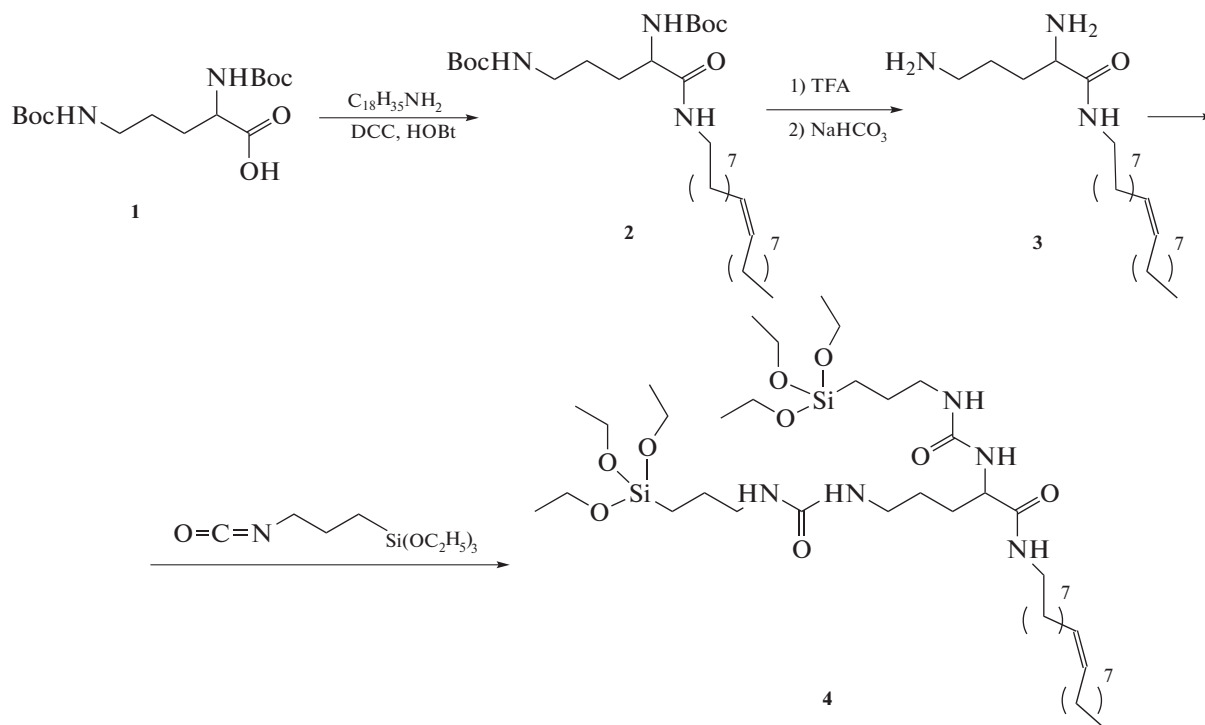


Схема 1.

Целевой КОЛ получали на основе *L*-орнитина. К ди-Вос-производному **1** присоединяли олеиламин и получали гидрофобную компоненту **2**. После удаления защитных групп получали КОЛ **4** реакцией деблокированного гидрофобного блока **3** с (3-триэтоксисил)пропилизотиоцианатом. Преимуществом выбранного реагента для формирования полярной головной группы липида является простота протекания реакции аминогруппы с изотиоцианатной группой при комнатной температуре. Кроме того, в структуре появляется производное мочевины, которая играет значительную роль в метаболизме многих веществ в организме [24]. Структуры полученных веществ подтверждали данными ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

В качестве катионных липидов были выбраны амфифилы на основе *L*-аланина (*L*-Ala) и *L*-серина (*L*-Ser), синтезированные нами ранее [23]. Они имеют общую схему строения и состоят из четырех структурных блоков: полярной головной группы, спейсера, линкера и гидрофобного домена (табл. 1). Во всех соединениях полярная головная группа сформирована *L*-лизинном, несущим две протонируемые аминогруппы. В качестве спейсера выступает *L*-аспарагиновая кислота. Линкер представлен аминокислотами *L*-Ala, *L*-Ser, боковые радикалы которых остаются свободными в целевых амфифилах. Гидрофобный блок представлен производными алифатических спиртов 1-тетрадеканолом C₁₄H₂₉ОН и 1-гексадеканолом C₁₆H₃₃ОН.

Основой для выбора данных комбинаций аминокислот и алифатических спиртов стали результаты расчета гидрофильно-липофильного баланса и критического параметра упаковки. Значения ГЛБ и КПУ коррелируются с возможностью самоорганизации в липидный бислой [25] и, следовательно, с созданием транспортных систем доставки лекарственных веществ (ГЛБ ~ 9–12) и эффективной доставкой генетического материала в ходе трансфекции (ГЛБ ~ 13–16). Расчеты КПУ показали, что синтезированные соединения образуют сферические бислойные агрегаты в водной среде (табл. 1).

Из синтезированных соединений и липидов-хелперов (РС, DOPE) были получены липосомальные дисперсии. Для физико-химических и биохимических тестов были сформированы дисперсии из катионных липидов, смеси КЛ + РС, КЛ + DOPE, КЛ + КОЛ. В образцах смеси КЛ + РС липиды взяты в соотношениях 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 для изучения наиболее оптимального соотношения. В смесях КЛ + DOPE и КЛ + КОЛ липиды взяты в соотношении 1 : 1 [26]. Методом фотонно-корреляционной спектроскопии были опре-

делены размеры частиц дисперсий на основе КЛ и КЛ + КОЛ. Диаметр липосом на основе всех катионных липидов не превышает 235 нм, что дает возможность им проникать в мелкие кровеносные сосуды (рис. 1а). Наибольший размер имеют агрегаты на основе *L*-аланина, это может быть следствием наличия двух объемных метильных групп в структуре липидов. Кроме того, удлинение углеводородных радикалов в гидрофобном блоке приводит к увеличению размеров частиц более чем на 60 нм для всех амфифилов. Наиболее компактными везикулами являются соединения на основе *L*-серина, их средний размер 82.9 нм. Добавление к катионным липидам керасомообразующего липида приводит к увеличению размеров агрегатов более чем в 1.5 раза для всех образцов (рис. 1б). Наибольший размер имеют липосомы с длиной углеводородного радикала 16 атомов углерода. Полученные значения для образцов KD(A16)2 и KD(S16)2 выходят за пределы оптимального диапазона распределения размеров частиц для эффективных липосомальных транспортных систем (не более 350 нм).

Для дисперсий на основе КЛ и КЛ + КОЛ определен дзета-потенциал, который является одним из факторов устойчивости зольей и дисперсных систем в водной среде. Известно, что наличие заряда на поверхности частиц препятствует их агрегации за счет электростатического отталкивания. Значения дзета-потенциала, лежащие в диапазоне 30–50 мВ, характеризуют систему как стабильный коллоидный раствор [27]. Для всех катионных липосом значения дзета-потенциала лежат в диапазоне 31–43 мВ (рис. 1в). Наличие в структуре ОН-групп *L*-серина приводит к незначительному уменьшению дзета-потенциала по сравнению с соединениями на основе *L*-аланина. Все смешанные липосомы КЛ + КОЛ имеют поверхностный заряд ниже, чем дисперсии на основе катионных липидов (29–36 мВ) (рис. 1г). Введение КОЛ оказывает существенное влияние на везикулы из липопептидов, в структуре которых присутствуют *L*-аланин. При этом значения дзета-потенциала для *L*-серина практически не меняются. Это можно объяснить количеством ОН-групп, которые образуются при гидролизе силоксановых головок керасомообразующего липида. Подтверждением гидролиза триэтоксисилильных групп в структуре КОЛ с последующим образованием полисилоксановой сети на поверхности везикул являются данные масс-спектрометрии MALDI или ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием [28]. Данные масс-спектрометрии MALDI показали, что для смешанных липосом КЛ + КОЛ на основе *L*-аланина возможен гидро-

Таблица 1. Значения ГЛБ и КПУ для синтезированных катионных липидов [23]

Шифр	Структура	ГЛБ	КПУ
KD(A14)2		12.49 ± 0.69	0.78
KD(A16)2		14.61 ± 0.69	
KD(S14)2		11.07 ± 0.71	0.77
KD(S16)2		13.20 ± 0.71	

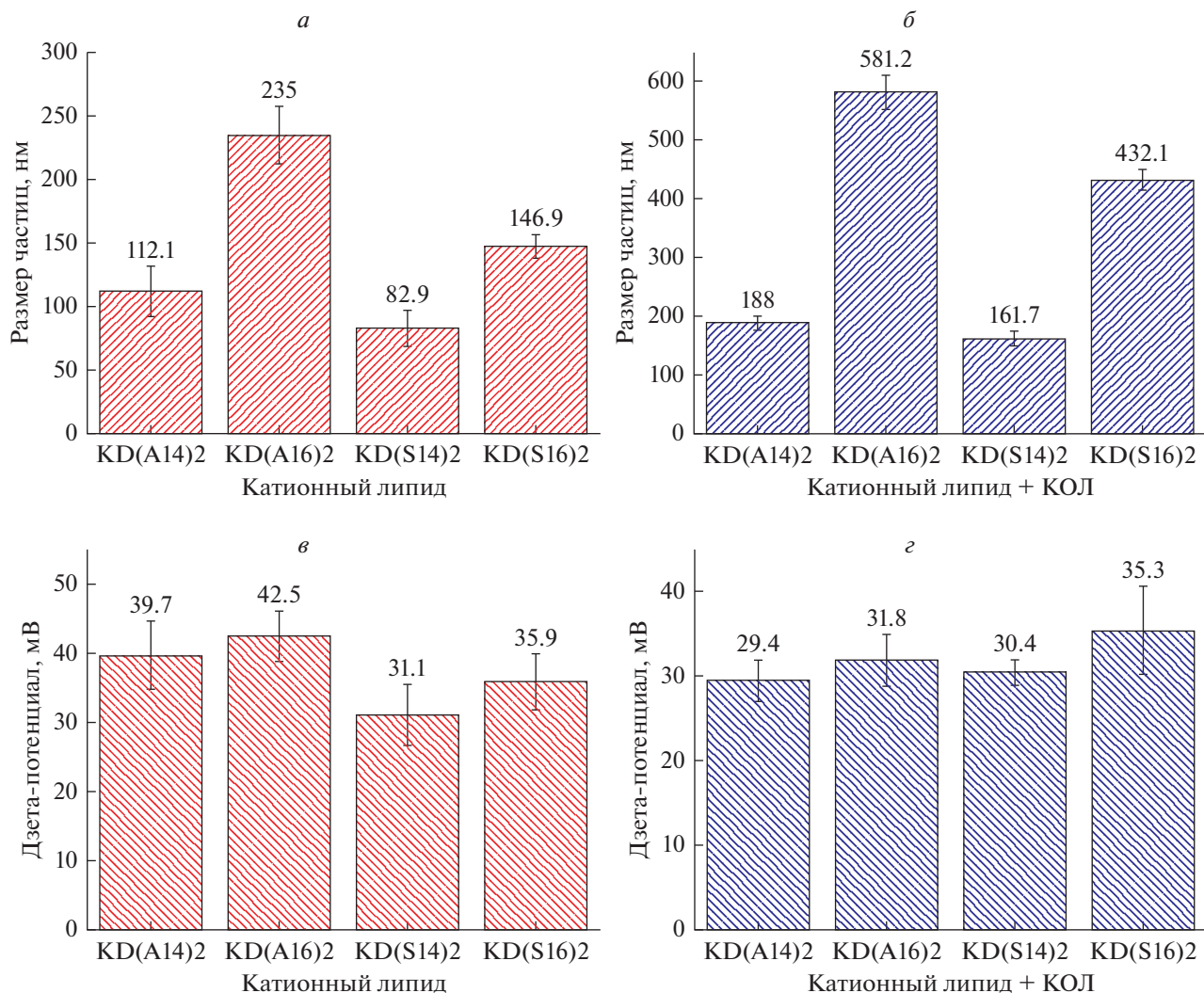


Рис. 1. Значения размера и дзета-потенциала катионных липосом (а, в) и смешанных липосом на основе КЛ + КОЛ (б, г).

лиз только части триэтоксисилильных групп (рис. S1). В смешанных липосомах КЛ + КОЛ на основе *L*-серина может происходить гидролиз всех триэтоксисилильных групп (рис. S2). Масс-спектрометрические исследования показали, что большинство липидных олигомеров находятся в виде мономеров или димеров.

Для липосом на основе КЛ, КЛ + КОЛ и КЛ + РС (2 : 1, 1 : 1, 1 : 2) была изучена стабильность при хранении при комнатной температуре и к действию дестабилизирующего агента Triton X-100. В качестве контроля были использованы липосомы из фосфатидилхолина. Для всех катионных липосом он оставался постоянным не менее 13 дней, а для смешанных липосом КЛ + КОЛ — не менее 15 дней. Увеличение количества фосфатидилхолина в липосомах на основе КЛ + РС (2 : 1, 1 : 1, 1 : 2) приводило к более скорой агрегации при комнатной температуре, а соотношение

1 : 1 оказалось оптимальным (не менее 7 дней) и было взято для эксперимента с детергентом. Результаты экспериментов с Triton X-100 свидетельствуют о том, что катионные и смешанные липосомы в несколько раз устойчивее к действию дестабилизатора по сравнению с липосомами на основе фосфолипида (рис. 2). Данные изменения оптической плотности указывают на то, что липосомы из фосфолипидов практически полностью солюбилизировались под действием детергента даже при небольшом их количестве, тогда как дисперсии исследуемых образцов стабильны при соотношениях $n(\text{Triton X-100})/n(\text{липид})$ более, чем 20 : 1 (рис. 2а и 2б). Аналогичный результат был получен в экспериментах с вытеканием водорастворимого красителя кальцеина из липосом (рис. 2в). Кальцеин полностью вытекает из липосом на основе фосфолипида POPC в течение 5 мин, тогда как для катионных и смешанных липосом выход красителя не превысил 10% за 10 мин.

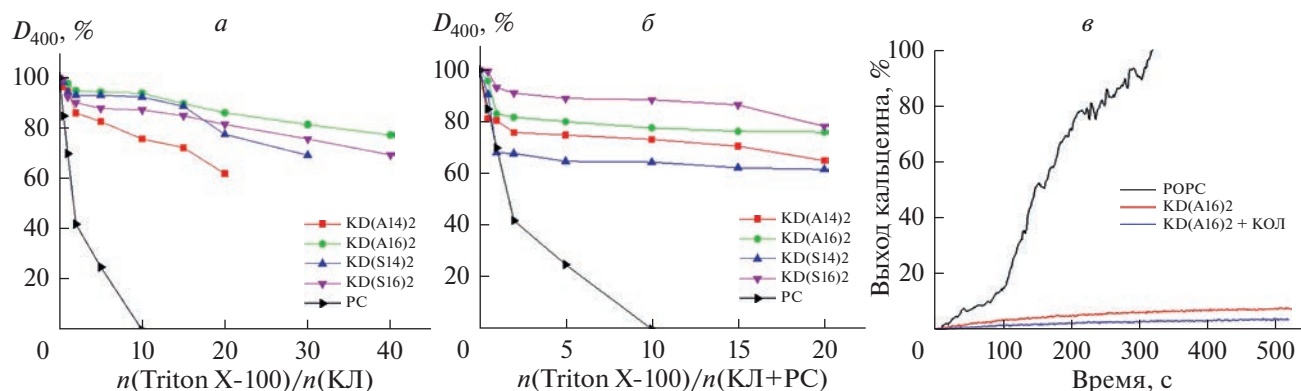


Рис. 2. Стабильность липосом к действию детергента Triton X-100. Показатель оптической плотности катионных липосом (а) и смешанных липосом КЛ + КОЛ (б). Степень вытекания кальцеина (%) из липосом (в).

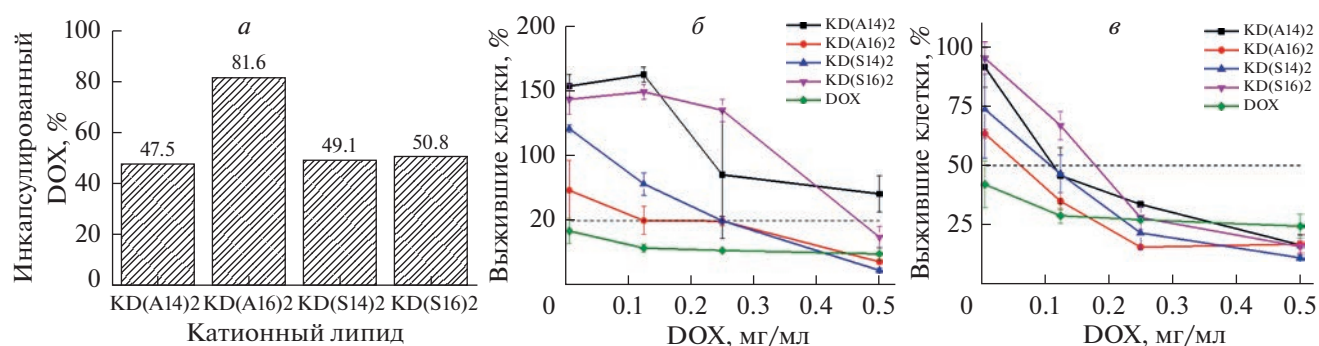


Рис. 3. Катионные липосомы как средства доставки противоопухолевого препарата доксорубина. а – Способность инкапсулировать DOX в смешанные липосомы КЛ + РС. Токсичность “пустых” (б) и загруженных DOX (в) смешанных липосом КЛ + РС на линии клеток MCF-7.

Это указывает на значительно большую устойчивость дисперсий из вновь синтезированных липидов.

Совокупность полученных данных о мембранообразующих свойствах липосом говорит о том, что дальнейшее применение смеси КЛ + КОЛ в экспериментах *in vitro* является нецелесообразным. Исследуемый КОЛ существенно не увеличивает стабильность агрегатов, при этом за счет двух силоксановых головок размер частиц возрастает более чем в 1.5 раза.

Смешанные липосомы КЛ + РС (1 : 1) исследовали на способность встраивать противоопухолевый препарат доксорубин. Липидные пленки гидратировали водным раствором доксорубина из расчета 400 мкг DOX на 1 мг липидов и подвергали обработке ультразвуком в течение 50 мин при 40°C. Липосомы KD(A16)2 на основе *L*-аланина показали лучший результат захвата антибиотика (81.6%), который может быть связан с большим размером частиц по сравнению с остальными образцами (рис. 3а).

Для определения безопасных рабочих концентраций изучена цитотоксичность дисперсий ли-

посом. Исследование проводили на линии клеток человеческой аденокарциномы молочной железы MCF-7 по данным МТТ-теста. В качестве исследуемых объектов использовали “пустые” и загруженные доксорубином смешанные липосомы на основе КЛ + РС = 1 : 1. В качестве контроля выступал чистый DOX. Результаты теста регистрировали через 48 ч. Все образцы “пустых” липосом являются менее токсичными, чем липосомы, загруженные антибиотиком (рис. 3б). Наиболее токсичным оказался образец KD(A16)2, IC_{50} которого составляет 0.125 мг/мл. Его токсичность может быть вызвана высокой гидрофобностью молекулы за счет *L*-аланина. Образец KD(S16)2 является самым безопасным, показатель IC_{50} составляет 0.475 мг/мл, а безопасная рабочая концентрация – 0.24 мг/мл. Токсичность липосом, нагруженных доксорубином, ниже токсичности чистого DOX (рис. 3в). При этом для образца KD(A16)2 высокая токсичность проявляется уже при концентрации 0.10 мг/мл. Такой эффект может быть вызван разной степенью загрузки DOX и устойчивостью агрегатов в условиях *in vitro* и, следовательно, скоростью высвобождения препарата из липосом.

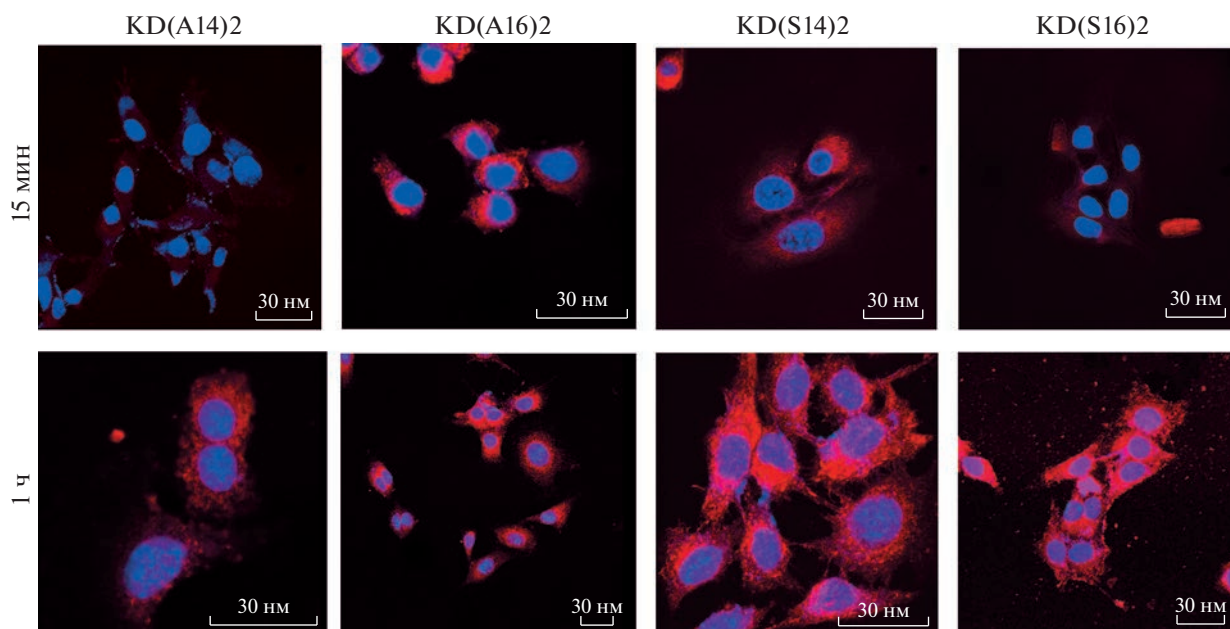


Рис. 4. Накопление смешанных липосом КЛ + РС в клетках MCF-7 через 15 мин и 1 ч.

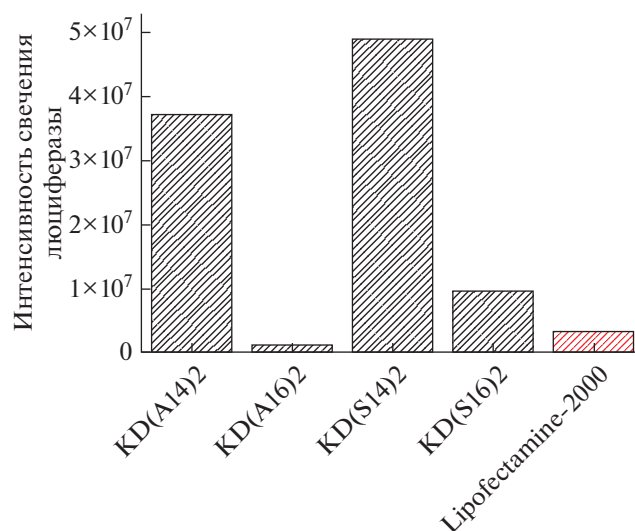


Рис. 5. Трансфекционная активность липоплексов, сформированных из смешанных липосом КЛ + DOPE и плазмидной ДНК, на линии клеток HEK 293.

На линии клеток MCF-7 с помощью конфокальной микроскопии проведен анализ распределения и накопления транспортных систем КЛ + РС = 1 : 1, загруженных доксорубицином, в клетке (рис. 4). Липосомы преодолевали плазматическую мембрану, проникали в клетку в течение 15 мин и локализовались в цитоплазме, а затем в течение 1 ч аккумулировались в мембране ЭПР. Наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась для образцов KD(A16)2 и KD(S14)2. KD(A16)2 уже через 15 мин практически полностью накапливался в мембране ЭПР, а KD(S14)2

в течение 15 мин локализовался в цитоплазме и через 1 ч — в ЭПР. Образцы KD(A14)2 и KD(S16)2 в течение 1 ч накапливались только в цитоплазме.

На линии клеток эмбриональной почки человека HEK 293 изучена эффективность трансфекции смешанных липосом на основе КЛ + DOPE = 1 : 1, оценивая уровень свечения исследуемых образцов после введения в клетки липоплексов с плазмидой, кодирующей ген люциферазы. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали коммерческий Lipofectamine-2000 и плазмиду pGL3 соответственно. Со-

отношение липосом и плазмидной ДНК (Р : N) было 1 : 16. Липосомы на основе КЛ с 14 атомами углерода в гидрофобном блоке показали результаты, в несколько раз превышающие уровень трансфекционной активности Lipofectamine-2000 (рис. 5). При этом наличие в структуре ОН-групп *L*-серина позволяет достичь высокой эффективности трансфекции независимо от длины углеводородных радикалов в гидрофобном домене. Введение остатков 1-гексадецилового спирта в структуру липида с *L*-аланином снижало трансфекционную активность ниже уровня активности коммерческого агента.

Таким образом, в ходе работы проведено комплексное изучение физико-химических, мембранообразующих и биохимических свойств липосомальных средств доставки противоопухолевого препарата и нуклеиновых кислот. Установлено, что комплексы с КОЛ имеют свойства, ограничивающие их использование в экспериментах *in vitro*.

Липосомы на основе *L*-аланина хорошо аккумулируются в клетках и проявляют трансфекционную активность, однако они токсичны. Соединения на основе *L*-серина являются перспективными для использования в качестве агентов доставки лекарственных веществ и генетического материала в клетки.

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

Источники финансирования. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

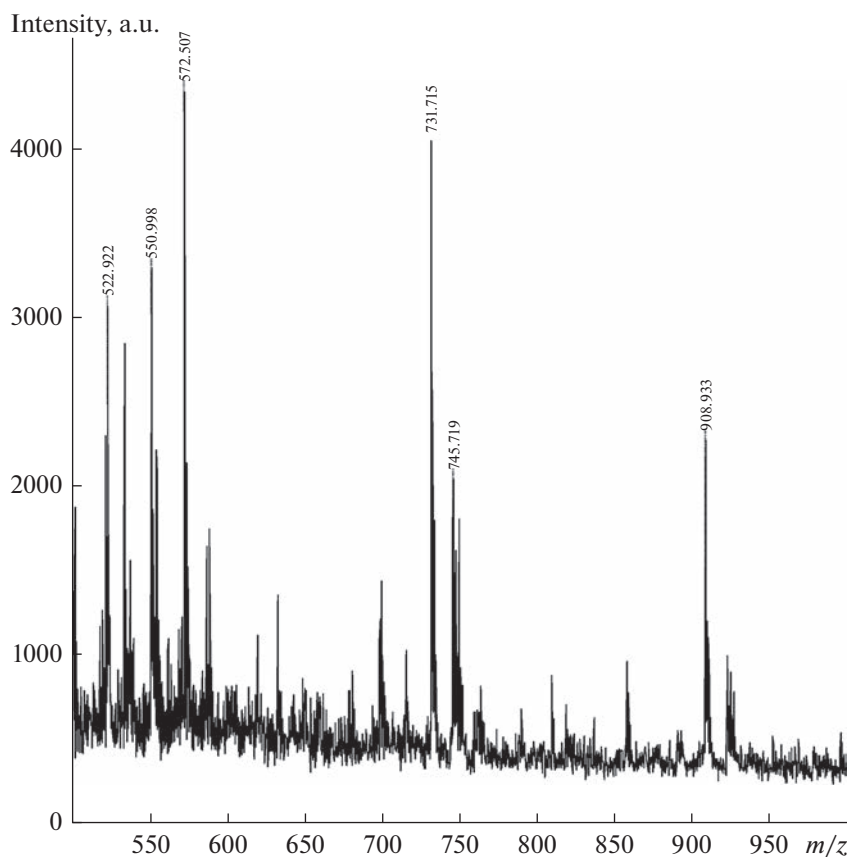


Рис. S1. Масс-спектр смешанных липосом на основе катионного липида KD(A16)2 и керасомообразующего липида (4). Для получения наиболее информативных масс-спектров исследования проводились с матрицей ДНВ (2,5-дигидроксибензойная кислота).

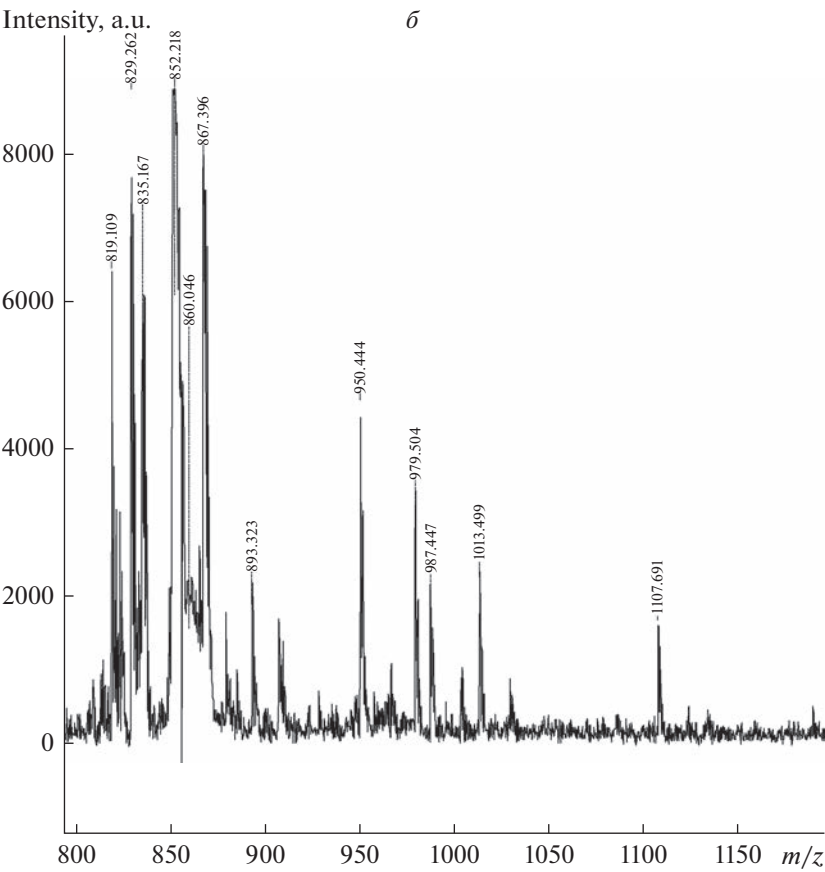
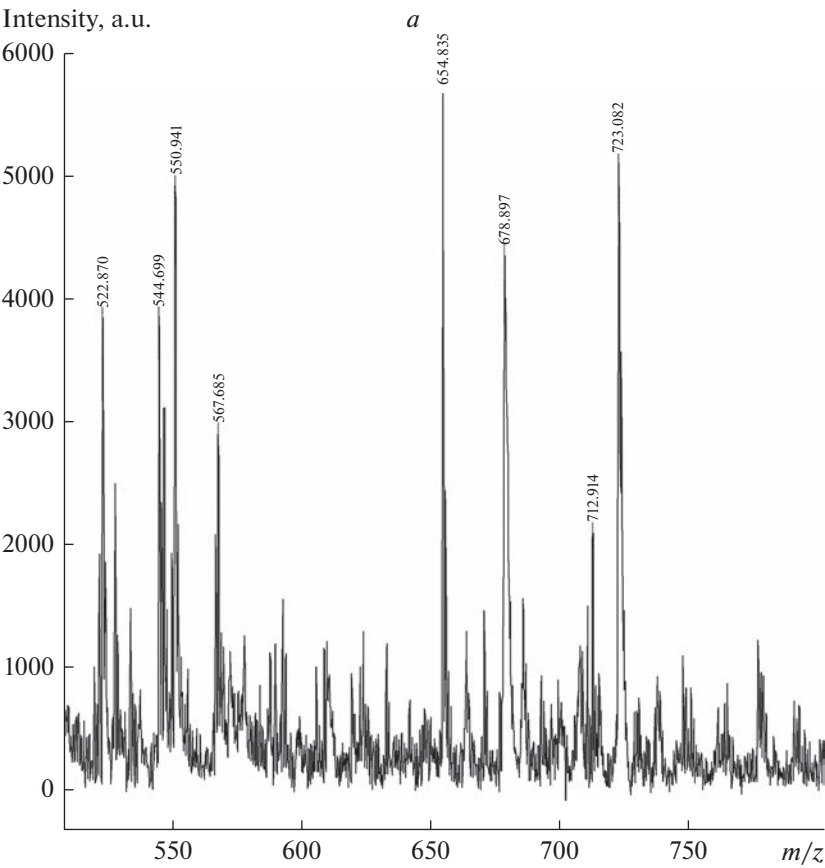


Рис. S2. Масс-спектр смешанных липосом на основе катионного липида KD(S14)2 и керасомообразующего липида (4). Для получения наиболее информативных масс-спектров исследования проводились с матрицей ДНВ (2,5-дигидроксibenзойная кислота). а – Масс-спектр в диапазоне 500–800 Да, б – в диапазоне 800–1200 Да

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu P., Chen G., Zhang J. 2022. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*. **27** (4), 1372.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. 2013. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. **8** (1), 102.
- Šturm L., Poklar Ulrih N. 2021. Basic methods for preparation of liposomes and studying their interactions with different compounds, with the emphasis on polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (12), 6547.
- Bozzuto G., Molinari A. 2015. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine*. **10**, 975–999.
- One focus. *Transfection protocol*. Mirus Transfectopedia. 2014. Madison, WI 53719 USA. <https://www.mirusbio.com/transfectopedia>.
- Khodthong C., Ismaili I., Juckem L. 2014. *The impact of transfection mediated toxicity – gene expression and cytotoxicity analysis of transfection reagents*. Mirus Bio, LLC. Madison, WI 53719 USA. <https://www.mirusbio.com/assets/technical-documents/the-impact-of-transfection-mediated-toxicity.pdf>.
- Shim G., Kim M.-G., Park J. Y., Oh Y.-K. 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian J. Pharm. Sci.* **8**, 72–80.
- Liang X., Li X., Jing L., Xue P., Jiang L., Ren Q., Dai Z. 2013. Design and synthesis of lipidic organoalkoxysilanes for self-assembly of liposomal nanohybrid cerasomes with controlled drug release properties. *Chem. Eur. J.* **19** (47), 16113–16121.
- Dharmalingam P., Rachamalla H.K.R., Lohchania B., Bandlamudi B., Thangavel S., Murugesan M.K., Banerjee R., Chaudhuri A., Voshavar C., Marepally S. 2017. Green transfection: Cationic lipid nanocarrier system derivatized from vegetable fat, palmstearin enhances nucleic acid transfections. *ACS Omega*. **2**, 7892–7903.
- Pires P., Simões S., Nir S., Gaspar R., Düzgünes N., Pedroso de Lima M.C. 1999. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*. **1418** (1), 71–84.
- Katagiri K., Ariga K., Kikuchi J.-I. 1999. Preparation of organic-inorganic hybrid vesicle “cerasome” derived from artificial lipid with alkoxysilyl head. *Chem. Lett*. **28**, 661–662.
- Wang Y., Wang B., Liao H., Song X., Wu H., Wang H., Shen H., Ma X., Tan M. 2015. Liposomal nanohybrid cerasomes for mitochondria-targeted drug delivery. *J. Mat. Chem. B*. **3**, 7291–7299.
- Sarker S. R., Takeoka S. 2018. Amino acid-based liposomal assemblies: Intracellular plasmid DNA delivery nanoparticles. *J. Nanomed*. **2**, 1008–1021.
- Faneca H., Simões S., de Lima M.C.P. 2002. Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta*. **1567**, 23–33.
- Liu Y., Mounkes L.C., Liggitt H.D., Brown C.S., Solodkin I., Heath T.D., Debs R.J. 1997. Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nat. Biotechnol.* **15**, 167–173.
- Templeton N.S., Lasic D.D., Frederik P.M., Strey H.H., Roberts D.D., Pavlakis G.N. 1997. Improved DNA:liposomes complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* **15**, 647–652.
- Nsairat H., Khater D., Sayed U., Odeh F., Al Bawab A., Alshaer W. 2022. Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. **8** (5), e09394.
- Silva S.G., Fernandes R.F., Marques E.F., do Vale M.L.C. 2012. Serine-based bis quat gemini surfactants: synthesis and micellization properties. *Eur. J. Org. Chem.* **2**, 345–352.
- Brito R.O., Oliveira I.S., Araújo M.J., Marques E.F. 2013. Morphology, thermal behavior, and stability of self-assembled supramolecular tubules from lysine-based surfactants. *J. Phys. Chem. B*. **117**, 9400–9411.
- Fan H., Han F., Liu Z., Qin L., Li Z., Liang D., Fu H. 2008. Active control of surface properties and aggregation behavior in amino acid-based gemini surfactant systems. *J. Colloid Interface Sci.* **321**, 227–234.
- McGregor C., Perrin C., Monck M., Camilleri P., Kirby A.J. 2001. Rational approaches to the design of cationic gemini surfactants for gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6215–6220.
- Yang P., Singh J., Wettig S., Foldvari M., Verrall R.E., Badea I. 2010. Enhanced gene expression in epithelial cells transfected with amino acid-substituted gemini nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**, 311–320.
- Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Y.L. 2021. Irregular cationic lipotetrapeptides for pharmaceutical multifunctional transport systems. *Mendeleev Communications*. **31** (4), 509–511.
- Niyomtham N., Apiratikul N., Suksen K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.E. 2015. Synthesis and in vitro transfection efficiency of spermine-based cationic lipids with different central core structures and lipophilic tails. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 496–503.
- Jones C. H., Chen C.K., Ravikrishnan A., Rane S., Pfeifer B.A. 2013. Overcoming nonviral gene delivery barriers: Perspective and future. *Mol. Pharm.* **10**, 4082–4098.
- Sheng R., Zhuang X., Wang Z., Cao A., Lin K., Zhu J.X.X. 2016. Cationic nanoparticles assembled from natural-based steroid lipid for improved intracellular transport of siRNA and pDNA. *Nanomaterials (Basel)*. **6**, 69–86.
- Sabin J., Prieto G., Ruso J. M., Hidalgo-Álvarez R., Sarmiento F. 2006. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *Europ. Phys. J. E*. **20**, 401–408.
- Cao Z., Zhu W., Wang W., Zhang C., Xu M., Liu J., Feng S., Jiang Q., Xie X. 2014. Stable cerasomes for simultaneous drug delivery and magnetic resonance imaging. *Int. J. Nanomedicine*. **9**, 5103–5116.

Mixed Cationic Liposomes Based on *L*-Amino Acids As Efficient Delivery Systems of Therapeutic Molecules into Cells

Z. G. Denieva^{1, *}, O. O. Koloskova², A. M. Gileva³, U. A. Budanova⁴, Yu. L. Sebyakin⁴

¹*Frumkin Institute of physical chemistry and electrochemistry, Russian Academy Of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, 115522 Russia*

³*Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

⁴*MIREA – Russian Technology University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology), Moscow, 119571 Russia*

**e-mail: zaret03@mail.ru*

This work aimed to produce mixed liposomes based on natural amino acids as vehicles for delivery of anti-cancer drugs and nucleic acids. Liposomes were formed from cationic lipids based on *L*-alanine and *L*-serine, a cerase-forming lipid based on *L*-ornithine, and phospholipids phosphatidylcholine (PC) or 1,2-di-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE). For the developed agents, particle size, zeta potential, and stability were determined, and the biological activity was studied on the MCF-7 and HEK 293 cell lines. Liposomes based on *L*-serine demonstrated the ability to accumulate in the endoplasmic reticulum of cells within 1 h, and their transfection activity significantly exceeded that of the commercial drug Lipofectamine-2000. At the same time, the proposed system had a slight toxic effect (IC₅₀, 0.475 mg/mL and the safe working concentration, 0.24 mg/mL).

Keywords: cationic amphiphiles, cerasoma-forming lipids, amino acid derivatives, targeted delivery, anticancer agents

УДК 576.5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА С ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК ГИППОКАМПА МЫШЕЙ 5XFAD ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. В. Чаплыгина^{a, *}, Д. Ю. Жданова^a, В. И. Ковалев^a,
Р. А. Полтавцева^b, Н. В. Бобкова^a

^aИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пущино, Московская обл., 142290 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России,
Москва, 117198 Россия

*e-mail: shadowhao@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 04.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

В работе изучен характер взаимного влияния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, и первичной культуры клеток гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей — модели наследственной формы болезни Альцгеймера (БА). Для идентификации ММСК в “химерной культуре” использовали антитела к ядерному человеческому антигену, принадлежность клеток к нейронам или астроцитам определяли по наличию позитивной иммунореактивности к маркерным белкам MAP2 и GFAP, соответственно. Показано, что результат взаимодействия зависит как от способа культивирования, так и от возраста культуры. При непрямом (бесконтактном) культивировании агрессивная среда трансгенной культуры влияла на выживаемость и ухудшала адгезивные свойства ММСК. Предварительная обработка этих клеток стресс-белками γ B-1 и HSP70, обладающими нейропротекторными свойствами, повышало резистентность ММСК. В молодой культуре при контактном культивировании ММСК играют роль специфических тяжей, способствующих группированию культуры клеток гиппокампа трансгенных мышей и образованию нейросфер. В старых трансгенных культурах вне зависимости от способа культивирования ММСК дифференцировались в астроциты, но при длительном прямом культивировании часть ММСК становилась иммунопозитивной к нейрональному маркеру MAP2. В работе показано, что взаимодействие ММСК с клетками культуры может осуществляться с участием щелевых контактов, а также благодаря формированию нанотрубок. Полученные результаты свидетельствуют о наличии сложных взаимоотношений донорских ММСК и клеток реципиента, что необходимо для внедрения клеточной терапии в практику лечения больных БА.

Ключевые слова: 5XFAD, мезенхимные стромальные клетки, первичная нейрональная культура, клеточная терапия

DOI: 10.31857/S0233475523030040, **EDN:** EWMQDL

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на широкое использования клеточной терапии в кардиологии, патологии периферической нервной системы и онкологии, ее применение для лечения нейродегенеративных заболеваний пока ограничено доклиническими испытаниями. Сложность проблемы обусловлена как свойствами самих клеток, выбираемых для трансплантации, так и спецификой нейродегенеративного процесса. В регенеративной медицине в качестве перспективного средства наиболее часто

рассматривают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) [1, 2], однако механизмы их терапевтического действия остаются не до конца выясненными.

Первоначально полагали, что эффективность ММСК связана со способностью к направленной миграции в патологический очаг и замене погибших и видоизмененных клеток. В последнее время их лечебный эффект также связывают с паракринной активностью, что проявляется в выделении целого ряда биологически активных соединений, таких как нейротрофический фактор глиального

происхождения (GDNF), NGF и BDNF, что способствует локальному подавлению патологического процесса [3–5]. Трансплантация ММСК животным с моделями БА оказывала положительное неврологическое воздействие [6, 7]. ММСК способны усиливать дифференцировку нейронов и индуцировать пролиферацию эндогенных нервных клеток-предшественников [7]. Недавние исследования показали наличие у ММСК системных эффектов, проявляющихся, в частности, в поддержании гомеостаза мозга [8, 9]. Также они могут способствовать эндогенному росту нейритов, вызывают синаптическое образование, снижают уровень свободных радикалов в локальном окружении, уменьшают апоптоз и регулируют воспаление [10–12]. В отношении ММСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, известно, что они могут регулировать секрецию GDF-15, играющего ключевую роль в иммуносупрессии, нейропротекции и регуляции роста клеток, а также усиливать способность микроглиальных клеток к клиренсу A β [13]. ММСК выделяют в среду как свободные биологически активные соединения, так и экстрацеллюлярные везикулы, содержащие различные цитокины, ангиогенные факторы и даже митохондрии [2, 9], которые попадают в клетки реципиента через механизм эндоцитоза, благодаря образованию наноканалов от ММСК к клеткам реципиентной культуры [14], а также образуя щелевые и межклеточные контакты классического типа [15–17].

В наших ранних исследованиях также был обнаружен позитивный эффект трансплантации фетальных нейрональных прогениторов и ММСК, выделенных из костного мозга или Вартонова студня пупочного канатика, на память ольфакторно бульбоэктомированных (ОБЭ) животных — модели спорадической формы БА [18, 19], что согласуется с исследованиями, в которых ММСК восстанавливают когнитивные способности и память [20]. На других животных моделях БА было показано, что позитивный эффект ММСК обусловлен активацией микроглии и очисткой мозговой ткани от патологических амилоидных бляшек, а также снижением амилоидогенного процессинга APP, снижением апоптоза нейронов и активацией нейрогенеза [21, 22]. При этом ММСК оказались относительно безопасными и эффективными нейропротекторами и иммуномодуляторами [23–26].

Таким образом, терапия на основе ММСК может иметь многообещающие перспективы. Однако во избежание неблагоприятных побочных эффектов трансплантации необходимо детально исследовать характер и последствия взаимного влияния донорских клеток и тканей реципиента. Характер влияния агрессивной среды мозга, пораженного нейродегенерацией, на выживаемость и пути дифференцировки трансплантированных

ММСК, а также подходы для повышения их резистентности изучали с использованием первичной культуры клеток гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей и ММСК из Вартонова студня пупочного канатика человека в условиях прямого и непрямого культивирования. В наших экспериментах исследована возможность повышать выживаемость ММСК и модулировать их адгезию под влиянием стресс-белков γ B-1 и HSP70, обладающих выраженным нейропротекторным эффектом [27–30]. В нашем исследовании также проанализирована способность ММСК к дифференцировке в астроциты и нейроны в зависимости от условий культивирования с гиппокампальной культурой мышей 5XFAD, моделирующей нейродегенеративный процесс в мозге при БА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия мышей 5XFAD. Работа выполнена на первичной культуре клеток гиппокампа новорожденных трансгенных мышей линии 5XFAD, которые коэкспрессируют шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации APP (695) человека, а также M146L и L286V мутации в пресенилине 1 с экспрессией обоих трансгенов под Thyl1 промотором. Клетки трансгенной культуры постепенно накапливают бета-амилоид, и используются как модель, в которой бета-амилоид является причиной дальнейшей нейродегенерации.

Исследование проведено в строгом соответствии с “Правилами проведения исследований с экспериментальными животными” (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Все процедуры на мышах были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизики клетки — Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/ 63/ЕС Европейского парламента.

Генотипирование мышей проводили с помощью ПЦР ДНК, выделенной из биоптатов уха. Наличие трансгенной кассеты выявлялось с помощью праймеров 5'-AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG TCT AGT TCT GCA T-3' с последующей электрофоретической визуализацией для выявления носителей трансгенной кассеты длиной 377 п.н. Трансгены вставлены в один локус Chr3:6297836, где они не влияют ни на какие известные гены.

ММСК. Получение ММСК из Вартонова студня пупочного канатика проводили имеющие специальное разрешение для подобного вида работ сотрудники ФГБУ “Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения РФ

(ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России) в рамках заключенного с этой организацией договора. Первичную культуру ММСК выделяли из Вартонова студня пупочного канатика, полученного после операции кесарева сечения от разных (не менее пяти) здоровых обследованных рожениц. Забор материала осуществляли с письменного информированного согласия доноров. Образцы тканей механически измельчали и помещали в 0.1% раствор коллагеназы типа I (Gibco) в течение 60 мин при 37°C. После инкубации суспензию осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 200 g. Осадок ресуспендировали в DMEM (Gibco) – F12 (ПанЭко, Россия) (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% Пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco) и помещали в культуральные флаконы объемом 25 см² (Corning). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂. При плотности культуры в 80% клетки снимали 0.05% трипсином (ПанЭко).

Методом проточной цитофлуориметрии был охарактеризован фенотип выделенных ММСК с применением специфических маркеров. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur и программного обеспечения BD CellQuest Pro (BD Biosciences, США). Клеточная популяция выделялась по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценивали экспрессию таких маркеров, как CD90, CD105, CD73, CD19, HLA-DR. Уровень экспрессии исследуемого маркера оценивали по гистограмме интенсивности флуоресценции. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили с использованием моноклональных антител, конъюгированных с фикоэритрином. Для анализа клетки снимали с поверхности флакона раствором трипсина, дважды промывали буфером для окрашивания (PBS, 1.0% эмбриональной сыворотки KPC и 0.1% азида натрия). К клеткам добавляли по 15 мкл меченых антител к одному из изучаемых поверхностных маркеров, доводя объем клеточной суспензии до 100 мкл. В образцы, служащие отрицательным контролем, добавляли соответствующие изотипические антитела. Клеточную суспензию инкубировали при температуре + 4°C в течение 1 ч. После инкубации клетки отмывали 2 раза в 1 мл буфера для окрашивания и фиксировали в 0.5 мл 2% раствора параформальдегида. Полученную клеточную суспензию фильтровали через фильтр с диаметром пор 30 мкм. Анализ интенсивности флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре-сортере FACS Aria (Becton Dickinson Co.).

В дальнейших экспериментах использовали клетки, прошедшие не более 6 пассажей.

Первичная культура клеток гиппокампа мышей линии 5XFAD. Культуры клеток гиппокампа получали из мозга новорожденных мышей. Гиппокамп механически измельчали, после чего обрабатывали раствором трипсина с EDTA (Trypsin-EDTA, Gibco). Далее суспензию клеток, вносили в лунки планшета, покрытые полилизинном (Poly-D-Lysine, Gibco), и добавляли нейробазальную среду Neurobasal Medium (Gibco), содержащую 2% биоактивной добавки B-27 Supplement (Gibco) и 1% пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco). Смена среды проводилась на четвертый день. Планшеты с культурами помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂), при температуре 37°C. Полученные нами 2D культуры клеток гиппокампа этих животных остаются жизнеспособными в течение более 30 дней культивирования, что позволяет провести полноценное исследование по анализу взаимовлияния ММСК и культуры гиппокампа с признаками нейродегенерации. Нами были использованы как молодые (14 дней), так и стареющие (28 дней) трансгенные культуры.

Совместное культивирование первичной культуры клеток гиппокампа мышей линии 5XFAD и ММСК. ММСК, снятые с культурального флакона, окрашивали трипановым синим для оценки количества нежизнеспособных клеток и далее подсчитывали их количество в камере Горяева. Совместное культивирование клеток проводилось двумя способами.

В первом случае на покровные стекла, покрытые полилизинном, крупной каплей наносили ММСК так, чтобы клетки находились на значительном удалении друг от друга и не слипались в агрегаты (соотношение количества ММСК к количеству клеток нейрональной культуры составляло 1 : 3), стекла оставляли в CO₂-инкубаторе на 2 ч для плотного прикрепления клеток. После этого стекла с прикрепленными ММСК располагали в лунках с предварительно подготовленными первичными культурами (непрямое культивирование). В этом случае между ММСК и клетками гиппокампальной культуры исключены прямые контакты, стекло с ММСК оснащается специальными ножками-держателями из парафильма и находится над культурой. Во втором случае ММСК вносили непосредственно в нейрональную культуру (прямое культивирование) в соотношении 1 : 3. Совместное культивирование проводилось в течение пяти дней, двух недель и, в одном случае, месяца.

Обработка ММСК стресс-белками. Для повышения выживаемости ММСК в агрессивных условиях трансгенной культуры проводилась предварительная обработка ММСК стресс-белками HSP70 и YB-1. Для этого среда в культуральном флаконе с ММСК на 2 ч заменялась на среду, содержащую 30 нМ стресс-белков, после чего в течение суток

проводилось не прямое культивирование ММСК с 14-дневной культурой трансгенных мышей.

Выживаемость клеток. Для анализа выживаемости ММСК клеток в гиппокампальных культурах применили два независимых теста.

1). MTS-тест на основе оценки метаболической активности — колориметрический тест для оценки метаболической окислительно-восстановительной активности клеток. Реактив MTS под действием митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных клеток восстанавливается до не растворимого в воде формазана фиолетового цвета. В экспериментальные планшеты добавляли MTS (исходная концентрация 5 мг/мл) по 10 мкл на лунку; клетки инкубировали в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе. Затем извлекали стекла с ММСК, перенося их в отдельные планшеты, и добавляли ДМСО. Клетки встряхивали на шейкере для лучшего перемешивания и растворения кристаллов формазана в ДМСО и переносили в лунки 96-луночного планшета. Эксперименты проводились в отсутствие интенсивного света, поскольку MTS и формазан фоточувствительны. Образцы были проанализированы на микропланшетном фотометре (Thermo Fisher) для измерения оптической плотности на фильтре 570 нм.

2). Тест с использованием двух флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (Invitrogen) и йодида пропидия PI (Thermo Scientific), которые растворяли в культуральной среде в рабочей концентрации 10 и 30 мкМ соответственно. После 30-мин инкубации клеток в среде с Hoechst 33342 в CO₂-инкубаторе добавляли йодид пропидия и изучали клетки под микроскопом. Таким образом, проводилась оценка влияния непрямого культивирования с ММСК на жизнеспособность гиппокампальных трансгенных культур возрастом 14 и 28 дней, а также оценивалось влияние трансгенной культуры на жизнеспособность самих ММСК.

Клеточная адгезия. В специальном эксперименте для изучения адгезионных свойств ММСК (прикрепление ММСК к поверхности стекла, обработанного опорным субстратом), ММСК, снятые с культурального флакона, окрашивали трипановым синим для оценки количества нежизнеспособных клеток и далее подсчитывали их количество в камере Горяева. На покровные стекла, покрытые опорным субстратом Poly-D-Lysine, крупной каплей наносили ММСК так, чтобы клетки находились на значительном удалении друг от друга и не слипались в агрегаты (соотношение количества ММСК к количеству клеток нейрональной культуры составляло 1 : 3), стекла оставляли в CO₂-инкубаторе на 2 ч для плотного приклепления клеток. После чего стекла с прикрепленными ММСК располагали в лунках с предварительно подготовленными первичными культурами напротив друг друга, разделенные только слоем культу-

ральной жидкости, в течение 5 дней. После этого стекла вынимали, в течение 10 мин фиксировали 4% параформальдегидом, после чего проводили съемку на микроскопе в светлом поле. В счетчике клеток в программе ImageJ подсчитывали количество оставшихся на стекле клеток. В качестве контроля клетки, посаженные аналогичным образом, находились в среде DMEM-F12.

Образование межклеточных контактов. Для оценки образования каналов между ММСК и клетками в трансгенной культуре гиппокампа мы предварительно в течение 30 мин при 37°C проводили окрашивание ММСК в бессывороточной среде, содержащей 10 мкМ кальцеина АМ (Sigma-Aldrich). В живых клетках не флуоресцентный кальцеин АМ после гидролиза ацетоксиметилового эфира внутриклеточными эстеразами превращается в кальцеин, флуоресцирующий в зеленой области спектра (возб./эмисс. 494/517 нм). Данный краситель может проходить через щелевые контакты и передаваться от клетки в клетку. После этого меченые клетки отмывали, снимали раствором трипсина с EDTA (Trypsin-EDTA) и осаждали центрифугированием (5 мин, 1000 об/мин). Осадок меченых кальцеином клеток суспендировали в полной ростовой среде, подсчитывали в камере Горяева и готовили суспензию с концентрацией 30000 клеток в 200 мкл для внесения в культуру клеток гиппокампа мыши. Совместное культивирование проводили в течение 3 ч. В качестве контрольных образцов служили ММСК, обработанные ингибитором щелевых каналов динатриевой солью карбенексолона (Sigma-Aldrich) в концентрации 100 мкМ. После совместного культивирования клетки фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали Hoechst 33342. Затем регистрировали области перераспределения зеленой флуоресценции от ММСК к клеткам культуры.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для каждого иммунофлуоресцентного анализа, культуры в течение 10 мин фиксировали 4% параформальдегидом. Затем увеличивали проницаемость мембран с помощью 0.2% раствора Triton X-100 и в течение часа при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS + 0.1% Tween 20) + 1% BSA с применением 10% ослиной сыворотки (Abscam, ab7475) и 5% козлиной сыворотки (Invitrogen, 31872). Культуры инкубировали с первичными антителами 3 ч при комнатной температуре, после чего окрашивали вторичными антителами в течение часа. После каждой процедуры клетки отмывали PBS 3 раза по 5 мин.

Оценка состояния ММСК проводилась через 5 суток их непрямого культивирования с первичной 14-дневной культурой гиппокампа трансгенных мышей. Способность к дифференцировке

ММСК в зрелые нейроны оценивалась по позитивной иммунореактивности к MAP2 (Thermo, pa10005, 1 : 200) с окраской вторичными антителами Alexa Fluor 633 (Invitrogen, A-21103, 1 : 1000), в астроциты — по реактивности к GFAP (Abcam, ab7260, 1 : 500) с окраской вторичными антителами DyLight 488 (GeneTex, GTX76757, 1 : 1000).

Также использовались первичные антитела Anti-MAP2 antibody — маркеры нейронов (Abcam, ab32454, 1 : 100), и Anti-GFAP antibody — маркеры астроцитов (Abcam, ab4674, 1 : 1000), MAB1281 Anti-Nuclei Antibody clone 235-1 для идентификации человеческих клеток (Chemicon, 1 : 100). Вторичная окраска производилась антителами с флуоресцентными метками: AlexaFluor 594 (Abcam, ab150076, 1 : 200), AlexaFluor 488 (Abcam, ab150169, 1 : 2000), AlexaFluor 555 (Abcam, ab206870, 1 : 100), Alexa Fluor 405 (Abcam, ab175660, 1 : 100), Alexa Fluor 405 (Abcam, ab175678, 1 : 200).

Статистический анализ. Результаты MTS-тестов воспроизводили в 10 повторах. Результаты окраски на выживаемость воспроизводили в 6 повторах, съемка производилась на микроскопе JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder на площади $2.95 \times 3.96 \text{ мм}^2$, состоящей из 121 снимка, из каждой серии анализировали не менее 15 изображений. Результаты тестов на адгезивные свойства клеток воспроизводили в 6 повторах, съемку проводили с использованием микроскопа Leica DM IL (объектив 20 $\times$, видимая площадь — 0.1 мм^2), в каждом повторе снимали по 10–15 изображений. Результаты иммуноцитохимических окрасок воспроизводились в 4 повторах. Съемка производилась на площади $2.95 \times 3.96 \text{ мм}^2$, состоящей из 121 снимка высокого разрешения (площадь снимка $0.268 \times 0.36 \text{ мм}^2$). Результаты тестов образования межклеточных контактов воспроизводились в 6 повторах, съемку проводили с использованием микроскопа Leica DM IL (объектив 20 $\times$, видимая площадь — 0.1 мм^2), в каждом повторе снимали по 10 изображений. Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения Sigma Plot 12.5 с оценкой достоверности по двустороннему *t*-критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Стьюдента–Ньюмана–Келса и Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены и охарактеризованы мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитометрический анализ показал, что эти клетки экспрессируют CD73, CD90 и CD105, а также HLA-ABC, но не экспрессируют лимфоидные маркеры (рис. 1), что полностью от-

вечает требованиям к идентификации клеток как ММСК [31].

Мы изучили клеточное взаимодействие между донорскими ММСК и клетками культуры трансгенных мышей 5XFAD в условиях прямого и непрямого культивирования, что позволяет оценить роль непосредственного межклеточного контакта в исследуемых взаимодействиях между клетками. Данный протокол культивирования удобен для оценки выживаемости клеток без необходимости маркерного разделения двух культур.

Непрямое культивирование. Анализ влияния ММСК на трансгенную культуру при непрямом культивировании показал, что процент погибших клеток в 14-дневной нативной трансгенной культуре составил $3.7 \pm 0.29\%$, а при ее культивировании с ММСК — $4.15 \pm 0.51\%$. На 4-й неделе культивирования в трансгенной культуре происходило резкое увеличение числа погибших клеток до $39.46 \pm 6.98\%$, что в целом характерно для стареющей трансгенной культуры, испытывающей дефицит нейрональной функции с одновременным перепроизводством астроглии. При ее культивировании с ММСК наблюдалась тенденция к снижению гибели клеток до $27.91 \pm 6.5\%$.

Сходные данные были получены при использовании MTS-теста (рис. 2). Трансгенная культура до и после культивирования с ММСК человека практически не изменяла параметры своей метаболической активности (0.18 ± 0.006 отн. опт. ед. в контроле и 0.17 ± 0.004 отн. опт. ед. после культивирования). Однако пребывание ММСК в агрессивной среде трансгенной культуры не только вызывало снижение метаболической активности ММСК с 0.11 ± 0.01 до 0.07 ± 0.004 отн. опт. ед. (рис. 2б), но и одновременно сопровождалось снижением жизнеспособности ММСК. Так, при непрямом культивировании ММСК с трансгенной культурой процент мертвых клеток среди ММСК составил $7.8 \pm 0.26\%$, при их выращивании в нейробазальной среде гибель ММСК составила всего $2.2 \pm 0.13\%$, что совпадает с процентом их выживаемости в естественной для них DMEM-F12 среде.

Иммуноцитохимическое окрашивание культуры ММСК после недельного непрямого культивирования с трансгенными клетками молодой 14-дневной культуры не выявило иммунопозитивности к маркерам MAP2, GFAP, что свидетельствует об отсутствии конечной дифференцировки ММСК в трансгенной культуре в указанных сроки.

В нашей работе была предпринята попытка повысить выживаемость ММСК в агрессивной среде трансгенной культуры применением двух стресс-белков YB-1 и HSP70. Установлено, что предварительная обработка указанными стресс-белками снижала гибель ММСК при их непрямом культивировании.

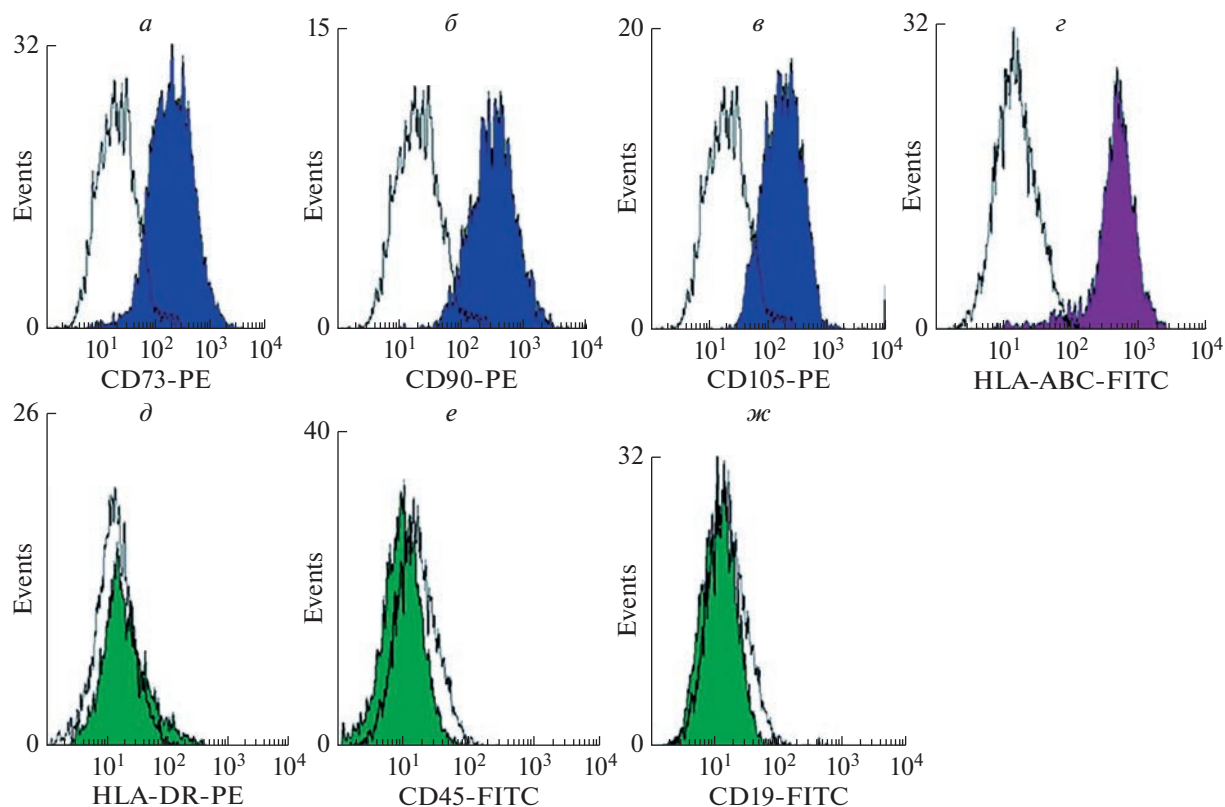


Рис. 1. Экспрессия специфических маркеров CD73 (а), CD90 (б), CD105 (в), HLA-ABC (г) и отсутствие экспрессии маркеров лимфоидных клеток HLA-DR (д), CD45 (е) и CD19 (ж) MMCK из Вартонова студня пупочного канатика человека.

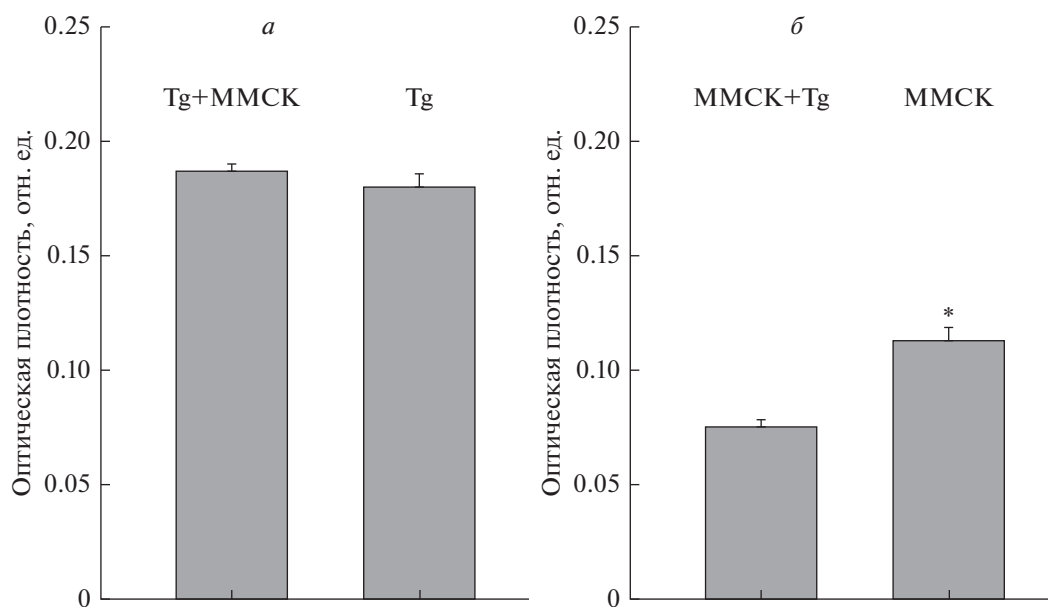


Рис. 2. Метаболическая активность клеток по результатам MTS-теста.

а – Метаболическая активность клеток трансгенной культуры до и после культивирования с MMCK. б – Метаболическая активность MMCK, культивируемых с трансгенной культурой, и в DMEM-F12 – их естественной среде.

* Различие между группами достоверно при $p = 0.003$ (t -тест).

мом культивировании с трансгенной культурой (рис. 3). Так, количество мертвых ММСК в трансгенной культуре при их раздельном культивировании после обработки YB-1 или HSP70 не отличалось от количества мертвых ММСК в естественной среде. Выбор этих белков был обусловлен их положительными эффектами, выявленными нами ранее на животных моделях спорадической и наследственной форм БА [27, 28], где также было установлено, что эти стресс-белки способны проникать внутрь клеток и повышать резистентность к токсическому действию бета-амилоида. Возможно, в отношении ММСК они оказывают такое же действие, повышая устойчивость ММСК к бета-амилоиду в трансгенной культуре.

Наблюдения над морфологическими изменениями ММСК в процессе их культивирования в разных условиях показали, что ММСК, обычно имеющие правильную полигональную форму с небольшим количеством боковых отростков (рис. 4а), в случае непрямого культивирования с трансгенной культурой демонстрируют разнообразные формы – от длинных “пикообразных” клеток до круглых и небольших клеток с маленькими отростками (рис. 4б).

При непрямом культивировании ММСК с нейрональной культурой трансгенных мышей мы наблюдали, что часть клеток открепляется от обработанного опорным субстратом стекла, что может происходить из-за открепления от субстрата как живых, так и мертвых клеток. Тогда оставшиеся клетки характеризуются способностью более прочно удерживаться на подложке благодаря адгезии, что можно определить количественно и статистически оценить по усредненному по 20 полям зрения на разных стеклах количеству оставшихся в одном поле зрения клеток. Сравнивая полученные данные, мы показали, что после культивирования ММСК с трансгенной культурой достоверно снижается количество клеток, оставшихся на стекле (рис. 4д). В наших экспериментах было показано, что предварительная обработка ММСК YB-1 и HSP70 увеличивает количество ММСК, оставшихся на стекле после культивирования (рис. 4е, 4з), т.е. улучшает адгезивные свойства ММСК.

Наши результаты согласуются с данными других авторов, что многофункциональный белок YB-1 способен влиять на клеточную адгезию путем модулирования экспрессии соответствующих генов. Показано, что сверхэкспрессия YB-1 может увеличивать адгезию клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы к фибронектину [29]. Нокдаун YB-1 влияет на молекулы клеточной адгезии (САМ) путем регуляции экспрессии гена ITGB8, связанного с САМ, значительно ингибирует клеточную адгезию клеток почечно-

клеточной карциномы *in vitro* [32]. Важно отметить, что ММСК тоже экспрессируют САМ [33], в частности ICAM-1, который необходим им для хоуминга в область повреждения, его сверхэкспрессия повышает эффективность целевой доставки и, соответственно, клеточной терапии [34]. Подобные данные получены и в отношении белка HSP70, способного модулировать клеточную адгезию. Так, было показано, что экзогенный HSP70 вызывает избыточную экспрессию молекул адгезии в мононуклеарных клетках периферической крови [30]. Можно предположить, что в наших условиях оба белка увеличивали адгезионные свойства ММСК. На метаболическую активность ММСК, их морфологию и гибель влияли изменение культуральной среды и паракринные факторы, выделяемые трансгенной культурой клеток. Эти результаты могут расширить стандартные подходы тканевой инженерии для решения проблем восстановления и регенерации тканей и могут быть применены для усиления адгезии ММСК при работе с композитными матрицами и в трансплантологии.

Прямое культивирование. В этом случае ММСК вносились непосредственно в первичную нейрональную культуру. Использование многопозиционной динамической съемки культур как в светлом поле, так и с использованием флуоресцентных каналов прибора JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder дало возможность проводить анализ состояния культур, находящихся в CO₂-инкубаторе, в процессе их роста. Длительное наблюдение позволило детально оценить характер взаимодействия ММСК с клетками первичной культуры гиппокампа в зависимости от возраста клеточной культуры. Через 2 недели культивирования с трансгенной культурой ММСК начинают дифференцировку в астроциты, иммуннопозитивные к GFAP и к ядерному человеческому антигену. Мы наблюдали появление, наряду с астроцитами, промежуточных астронейрональных форм, одновременно иммуннопозитивных и к MAP2, что происходит на фоне прогрессирующей гибели 28-дневной культуры клеток гиппокампа трансгенных мышей (рис. 5а). Ранее нами было показано, что на этом сроке культивирования культура, в отличие от молодой, характеризуется значительным снижением клеточной плотности на фоне повышения астроцитарного индекса за счет уменьшения количества нейронов и возрастания числа астроцитов [35]. Такое состояние культуры соответствует фазе астроглиоза и гибели нейронов под влиянием бета-амилоида, который на этом сроке активно продуцируется клетками гиппокампа в культуральную среду. По-видимому, на этом этапе развития нейродегенеративного процесса в культуре также продуцируются факторы, способствующие дифференцировке ММСК в астроциты. При этом стоит отметить, что анализ

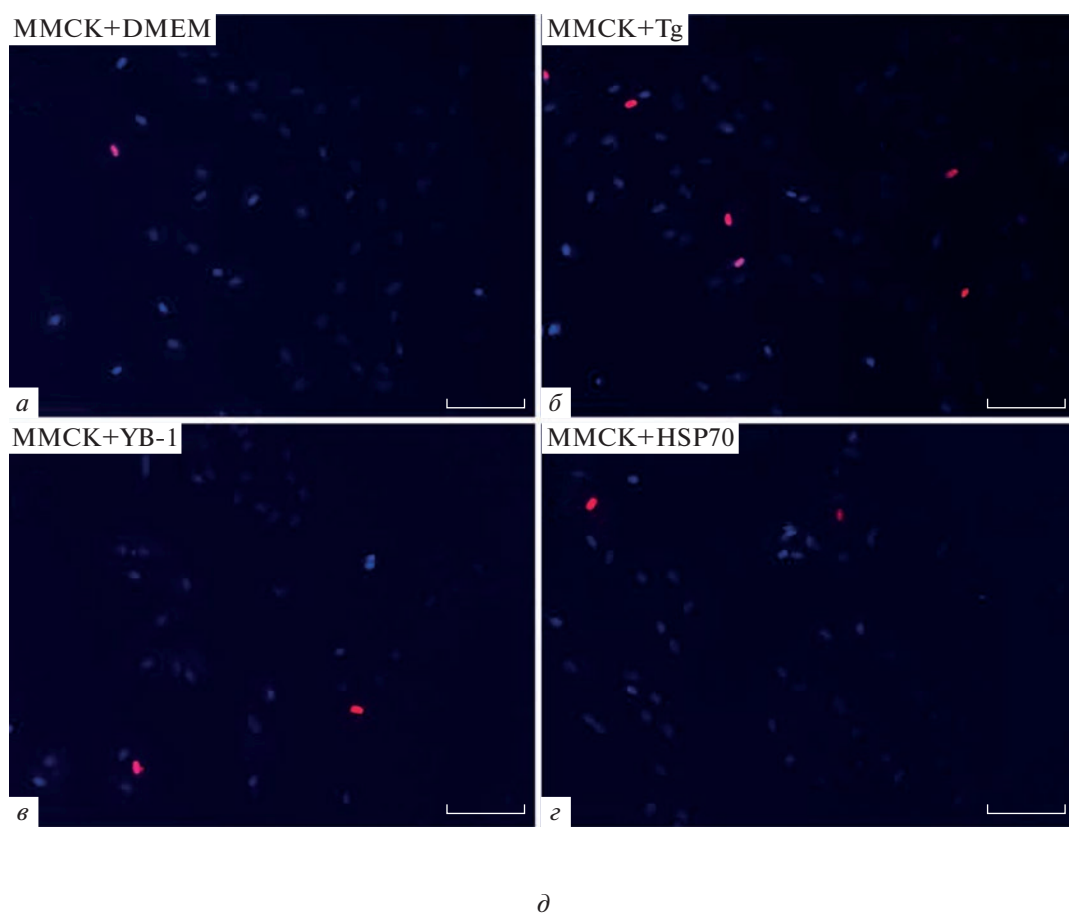


Рис. 3. Предварительная обработка MMCK стресс-белками HSP70 и YB-1 снижает интенсивность их гибели при не-прямом культивировании с трансгенной культурой.

а–г – Репрезентативные изображения с окрашиванием Hoechst 33342/PI. Шкала 60 мкм.

д – Отличие от группы MMCK + Tg достоверно при $p < 0.05$ (тест Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

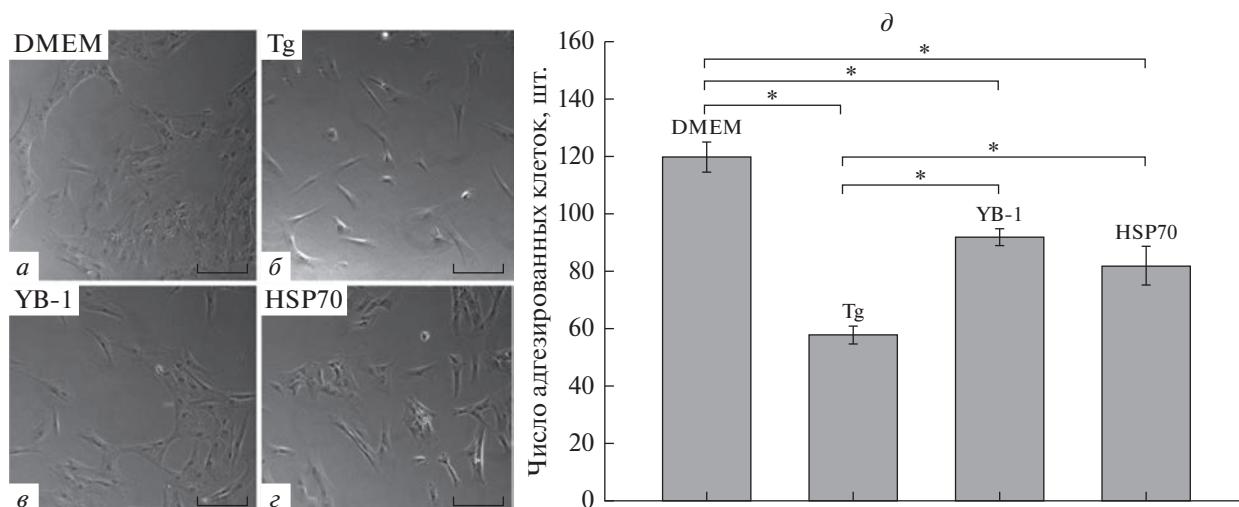


Рис. 4. Морфология и адгезированные ММСК.

a–г – Репрезентативные изображения морфологии и клеточной плотности ММСК на стекле при непрямом культивировании в разных условиях. Шкала 60 мкм.

д – Средняя плотность ММСК в поле зрения при культивировании в среде DMEM-F12, при непрямом культивировании с трансгенной культурой и при обработке ММСК YB-1 и HSP70 с последующим культивированием с трансгенной культурой. * Различия между указанными группами достоверны при $p < 0.05$.

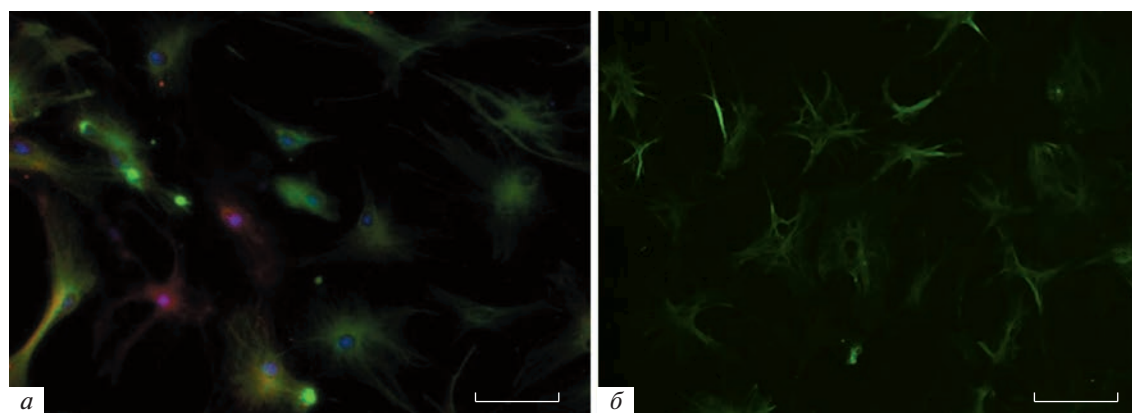


Рис. 5. Дифференцировка ММСК в астроциты в старой трансгенной культуре.

a – Прямое культивирование со старой трансгенной культурой (микроскоп JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder).
б – Непрямое культивирование со старой трансгенной культурой (микроскоп Leica DMIL LED Fluor).

Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к MAP2, синим цветом – иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear. Шкала 60 мкм.

продолжительного непрямого культивирования ММСК со старой нейрональной культурой также показал дифференцировку ММСК в астроциты (рис. 5б). Таким образом, в старых культурах трансгенных мышей ММСК становятся астроцитами даже без прямого клеточного контакта, что, как мы полагаем, связано, в первую очередь, с изменением состава культуральной среды под действием жизнедеятельности клеток гиппокампа трансгенных мышей.

Дополнительно мы провели длительный эксперимент, при котором ММСК более месяца находились в культуре клеток гиппокампа. Было

показано, что ММСК используют мышиную нейроглиальную культуру как своеобразную подложку для своей дальнейшей жизнедеятельности и через месяц почти все ММСК становятся иммунопозитивными к MAP2, в отдельных случаях они имеют форму классических нейронов (рис. 6). Возможно, более продолжительное культивирование приведет к появлению в культуральной планшете новых нейронов и образованию нейрональной сети.

Интересно отметить, что в молодой трансгенной культуре ММСК оставались недифференцированными (рис. 7а–7в) и способствовали обра-

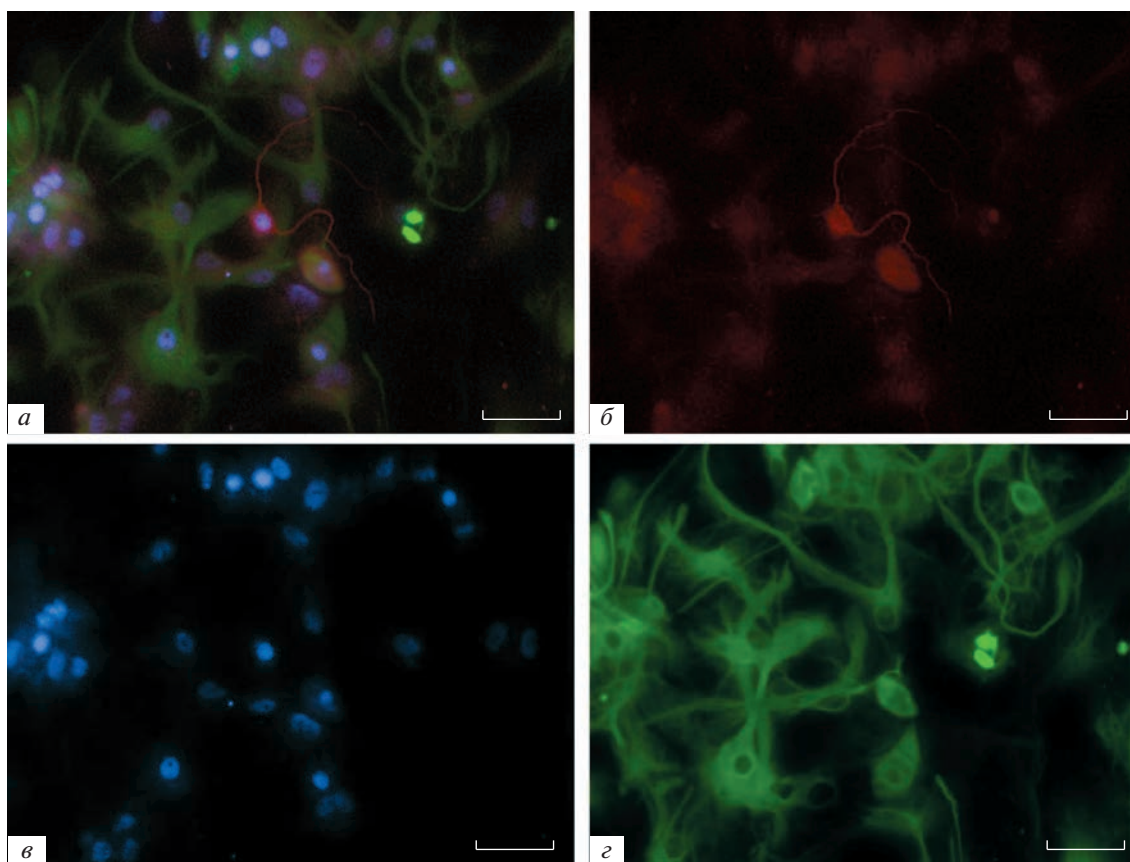


Рис. 6. Дифференцировка ММСК в нейроны в старой трансгенной культуре при длительном, более месяца прямом культивировании. Шкала 60 мкм.

а — Изображение с трех флуоресцентных каналов, *б* — иммунопозитивность к маркеру нейронов MAP2, *в* — иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear, *з* — иммунопозитивность к маркеру астроцитов GFAP.

зованию нейросфер из клеток гиппокампальной культуры (рис. 7*а–7в*, 8*а*). Стоит отметить, что в культуральном планшете практически не остается свободной мозаичной культуры, и все клетки первичной культуры гиппокампа оказываются собранными в плотные нейросферы. На рис. 8 более подробно представлена морфология такой нейросферы.

Обработка ММСК белком YB-1 также препятствует дифференцировке ММСК в астроциты в старой трансгенной культуре (рис. 7*г–7е*) и приводит к тому, что они сохраняют способность формировать небольшие нейросферы из клеток культуры (рис. 9*и–9м*). Обработка ММСК белком YB-1 путем добавления его в среду культивирования ММСК усиливает их эффект на формирование нейросфер как в молодой, так и старой культурах трансгенных мышей (рис. 9*д–9з*, рис. 9*и–9м*). В случае предварительной обработки ММСК белком YB-1 наблюдалось формирование более крупных нейросфер, которые мы склонны рассматривать как зрелые нейросферы. Полученные результаты в целом соответствуют представлению

о YB-1 как о факторе, усиливающем пролиферацию и способствующем активному развитию культуры.

По-видимому, в определенных условиях ММСК могут вести себя подобно нервным прогениторным клеткам — клеточным штаммам мультипотентных клеток, генерирующим все типы клеток, необходимые для центральной нервной системы, за исключением микроглии. У млекопитающих поддержание пула взрослых нервных прогениторных клеток происходит в субвентрикулярной зоне, граничащей с боковыми желудочками, откуда клетки в основном мигрируют в обонятельную луковицу, а также в субгранулярной зоне зубчатой фации гиппокампа. Клетки, выделенные из этих нейрогенных зон и помещенные в культуральные флаконы, образуют подобные нейросферы, что указывает на их нейрогенный потенциал. Нейросферы представляются многими исследователями как *in vitro*-модель эмбрионального нейрогенеза. При этом в нейросферах происходят сложные процессы, обусловленные как зрелостью сфероформирующих клеток, так и меж-

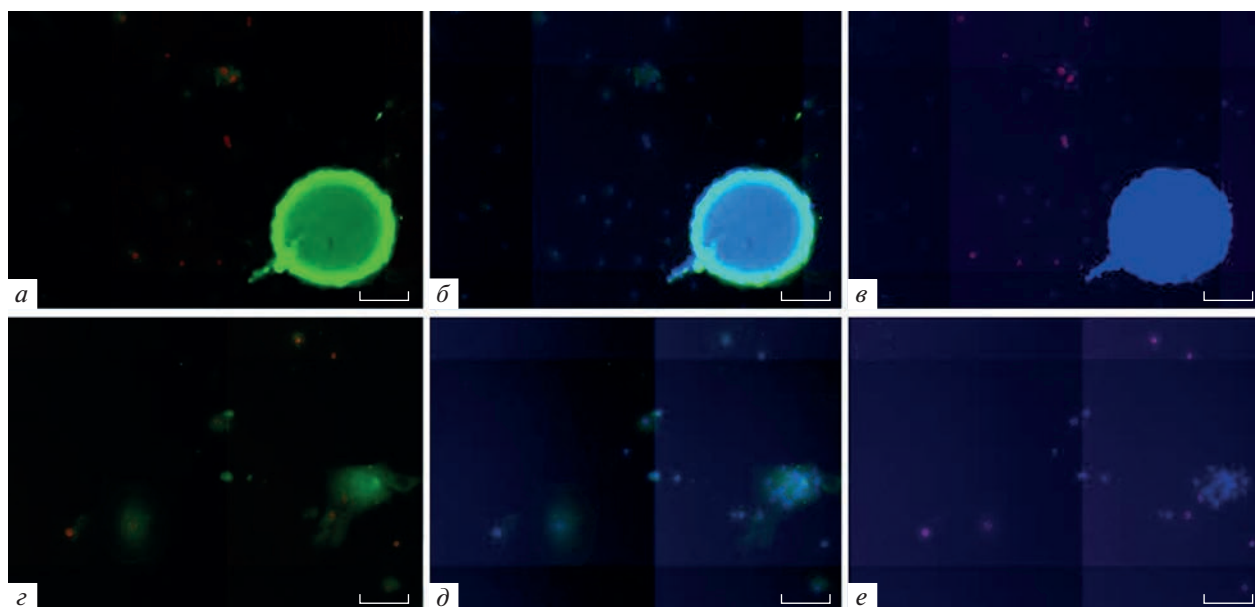


Рис. 7. ММСК остаются недифференцированными в молодой трансгенной культуре, а также в старой трансгенной культуре под действием УВ-1.

a–в – ММСК не дифференцируются в астроциты в молодой трансгенной культуре, *г–е* – ММСК не дифференцируются в астроциты в старой трансгенной культуре под влиянием УВ-1. Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear, синим цветом отмечены ядра, окрашенные Hoechst 33342. Шкала 60 мкм.

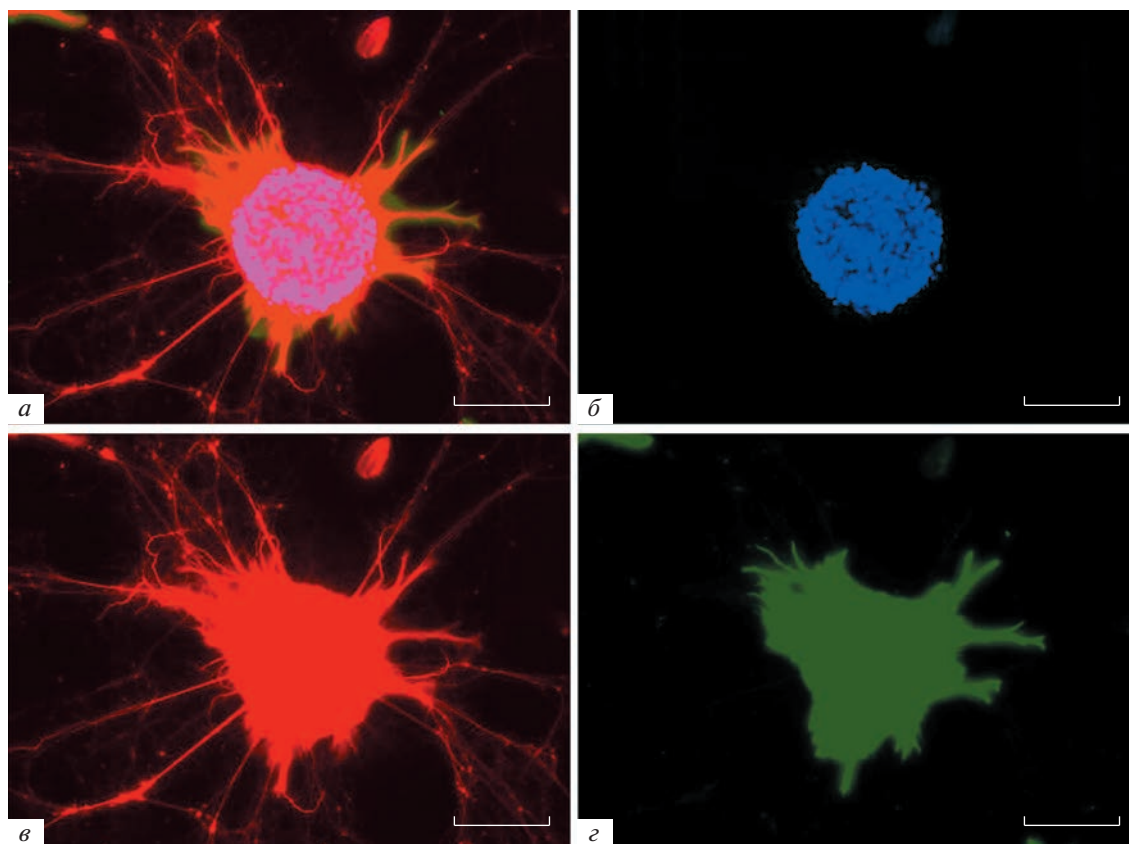


Рис. 8. Организация нейросфер в молодой трансгенной культуре под влиянием ММСК + УВ-1. Шкала 60 мкм.

a – Суммарное изображение с трех флуоресцентных каналов, *б* – клеточные ядра, окрашенные Hoechst 33342, *в* – иммунопозитивность к маркеру нейронов MAP2, *г* – иммунопозитивность к маркеру астроцитов GFAP.

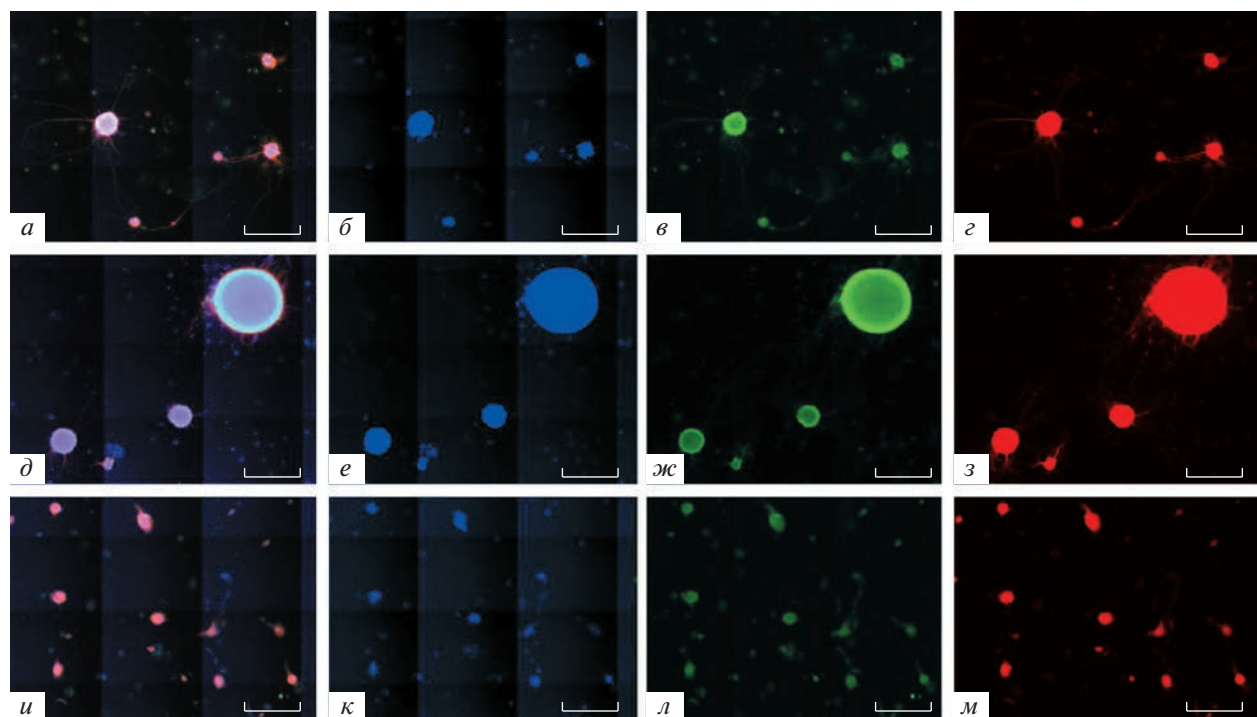


Рис. 9. Организация нейросфер в молодой трансгенной культуре под влиянием ММСК и ММСК + YB-1 (суммарное изображение с трех флуоресцентных каналов).

а–г — Образование нейросфер в молодой трансгенной культуре под действием ММСК. *д–з* — Образование нейросфер в молодой трансгенной культуре под действием ММСК + YB-1. *и–м* — Образование нейросфер в старой трансгенной культуре под действием ММСК + YB-1. Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к MAP2, синим цветом отмечены ядра, окрашенные Hoechst 33342. Шкала — 250 мкм.

клеточными взаимодействиями и влиянием микроокружения, что приводит к обновлению пула прогениторных клеток, продуцируемых нейросферами, их коммитированию и дальнейшей пролиферации [36].

В условиях среды DMEM-F12 ММСК не свойственно образование нейросфер. Стоит отметить, что в наших условиях ММСК также не входили в состав нейросфер, однако с помощью специфических тонких отростков (тяжей), стягивающих разрозненные клетки мозаичной трансгенной культуры, они способствовали формированию нейросфер. Полученные при реализации протокола нейросферы представляют интерес в качестве потенциальной модели для исследования созревания, коммитирования, пролиферации и дифференцировки клеточных колоний.

Известно, что ММСК может реализовать несколько способов связи с клетками. В ходе экспериментов мы наблюдали, что уже через 3 ч ММСК формируют “тяжи”, контактирующие с клетками гиппокампа трансгенных мышей (рис. 10в). Это могут быть туннелеобразующие трубки, способные обеспечивать передачу частей цитоплазматической мембраны, компонентов цитоплазмы, а также везикул и органелл, включая целые мито-

хондрии [37]. Другим способом прямой коммуникации клеток могут быть щелевые контакты. Мы наблюдали, что вокруг ММСК, предварительно насыщенных кальцеином, присутствуют клетки культуры со слабым флуоресцентным сигналом (рис. 10б). Статистическая оценка интенсивности зеленой флуоресценции от ММСК и мест в культуре на разном удалении от ММСК показала достоверное увеличение интенсивности флуоресценции вокруг клеток, контактирующих с ММСК (рис. 10г). В лунках планшета, в которые вместе с ММСК в культуру добавляли блокатор щелевых контактов карбенексолон, перераспределение интенсивности флуоресценции кальцеина не наблюдали, что подтверждает участие щелевых контактов во взаимодействии ММСК с клетками культуры гиппокампа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ММСК являются перспективными агентами для лечения нейродегенеративных заболеваний, хотя механизм действия трансплантированных в мозг клеток остается не до конца выясненным. В данном исследовании проведен детальный анализ состояния человеческих ММСК, введенных в

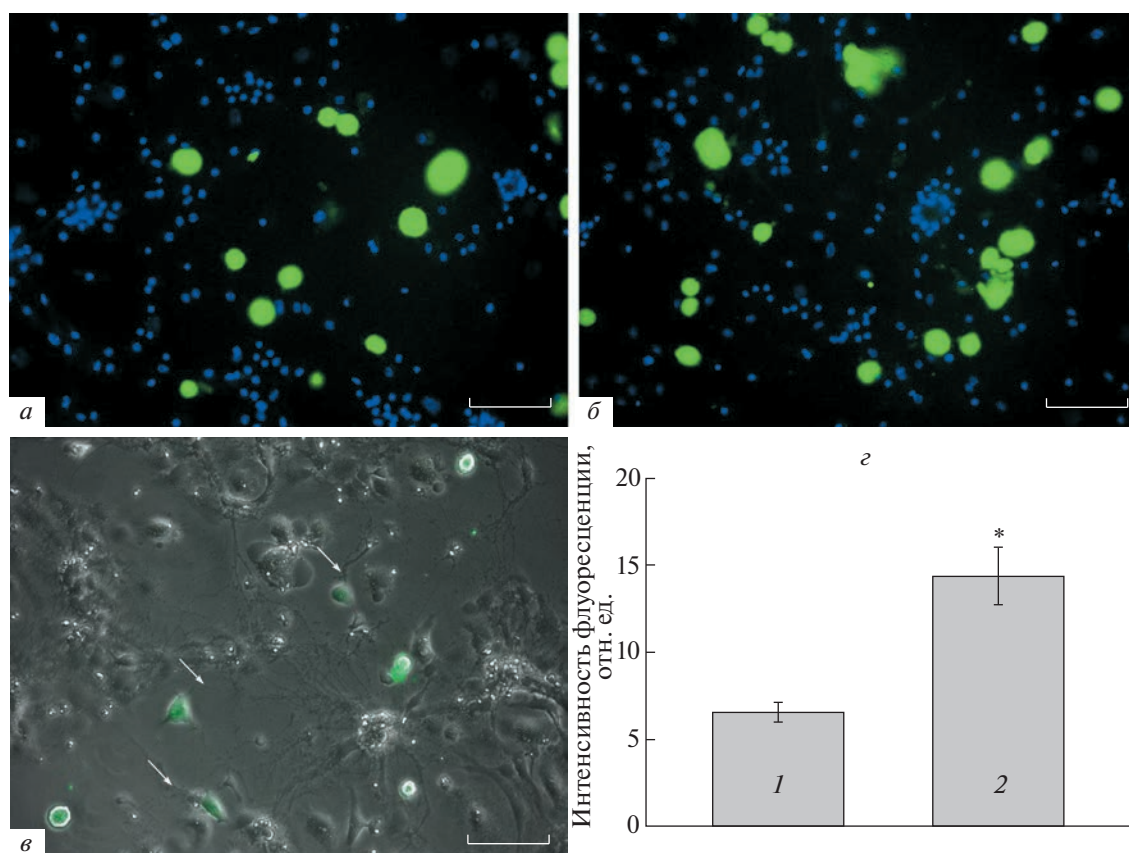


Рис. 10. Щелевые каналы и туннельные нанотрубки, образуемые ММСК. Шкала 60 мкм.

a – Отсутствие перераспределения зеленой флуоресценции от ММСК к клеткам культуры гиппокампа мыши (синяя флуоресценция принадлежит ядрам, окрашенным Hoechst 33342) в присутствии блокатора щелевых каналов.

б – Заметное перераспределение зеленого красителя от ММСК к клеткам культуры.

в – Формирование туннельных нанотрубок (показаны стрелочками) клетками ММСК (зеленая флуоресценция).

г – Интенсивность зеленой флуоресценции кальцеина вокруг клеток культуры, контактирующих с ММСК: 1 – культивирование при добавленном блокаторе щелевых каналов; 2 – культивирование без блокатора. * Различия между группами 1 и 2 достоверно при $p < 0.001$.

культуру клеток гиппокампа трансгенных животных, характеризующихся развитием нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа. Такая химерная клеточная модель позволила в эксперименте близко воспроизвести условия клинического использования этих клеток, а также исследовать особенности клеточных взаимодействий при прямом и непрямом клеточном контакте. Наши эксперименты показывали, что способы культивирования влияют как на интенсивность и направленность дифференцировки самих ММСК (дифференцировка их в астроциты и нейроны в старых трансгенных культурах и отсутствие дифференцировки в молодых культурах), так и на морфофункциональные характеристики и выживаемость культуры клеток реципиента (образование нейросфер из клеток молодой культуры трансгенных животных под действием организующей роли ММСК). Полученные результаты расширили понимание взаимодействий ММСК в химерной культуре, что в дальнейшем

позволит усовершенствовать подбор условий для клеточной терапии патологических процессов в мозге больных БА и других нейродегенеративных заболеваний.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (Проект № 18-15-00392).

Соответствие принципам этики. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей, выполненных кем-либо из авторов. Получение ММСК проводили имеющие специальное разрешение для подобного вида работ сотрудники ФГБУ “Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения РФ в рамках заключенного с этой организацией Договора. Исследование проведено в строгом соответствии с

“Правилами проведения исследований с экспериментальными животными” (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Все процедуры на мышах были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизики клетки — Пушинский научный центр биологических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sivandzade F., Cucullo L. 2021. Regenerative stem cell therapy for neurodegenerative diseases: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (4), e2153.
2. Carp D.M., Liang Y. 2022. Universal or personalized mesenchymal stem cell therapies: Impact of age, sex, and biological source. *Cells*. **11** (13), e2077.
3. Goncalves K., Przyborski S. 2018. The utility of stem cells for neural regeneration. *Brain Neurosci. Adv.* **2** (2), e239821281881807
4. Behrstock S., Ebert A.D., Klein S., Schmitt M., Moore J.M., Svendsen C.N. 2008. Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF. *Cell Transplant.* **17** (7), 753–762.
5. Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H., Castello N.A., Müller F.J., Loring J.F., Yamasaki T.R., Poon W.W., Green K.N., LaFerla F.M. 2009. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106** (32), 13594–13599.
6. Chaplygina A.V., Zhdanova D.Y., Kovalev V.I., Poltavtseva R.A., Medvinskaya N.I., Bobkova N.V. 2022. Cell therapy as a way to correct impaired neurogenesis in the adult brain in a model of Alzheimer's disease. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **58** (1), 117–137.
7. Kim S., Chang K.A., Kim J.A., Park H.G., Ra J.C., Kim H.S., Suh Y.H. 2012. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease mice. *PLoS One*. **7** (9), e45757.
8. Bruno S., Kholia S., Deregibus M.C., Camussi G. 2019. The role of extracellular vesicles as paracrine effectors in stem cell-based therapies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1201**, 175–193.
9. Yin K., Wang S., Zhao R.C. 2019. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: A new therapeutic paradigm. *Biomark. Res.* **7**, 8.
10. Joyce N., Annett G., Wirthlin L., Olson S., Bauer G., Nolta J.A. 2010. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* **5** (6), 933–946.
11. Xin D., Li T., Chu X., Ke H., Liu D., Wang Z. 2021. MSCs-extracellular vesicles attenuated neuroinflammation, synapse damage and microglial phagocytosis after hypoxia-ischemia injury by preventing osteopontin expression. *Pharmacol. Res.* **164**, e105322.
12. Nair S., Rocha-Ferreira E., Fleiss B., Nijboer C.H., Gressens P., Mallard C., Hagberg H. 2021. Neuroprotection offered by mesenchymal stem cells in perinatal brain injury: Role of mitochondria, inflammation, and reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **158** (1), 59–73.
13. Kim D.H., Lee D., Lim H., Choi S.J., Oh W., Yang Y.S., Chang J.H., Jeon H.B. 2018. Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on amyloid beta levels in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **504** (4), 933–940.
14. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. 2016. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* **7** (1), 125.
15. Ramkisoensing A.A., Pijnappels D.A., Swildens J., Goumans M.J., Fibbe W.E., Schalij M.J., de Vries A.A.F., Atsma D.E. 2012. Gap junctional coupling with cardiomyocytes is necessary but not sufficient for cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. **30** (6), 1236–1245.
16. Matuskova M., Hlubinova K., Pastorakova A., Hunakova L., Altanerova V., Altaner C., Kucerova L. 2010. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* **290** (1), 58–67.
17. Kikuchi-Taura A., Okinaka Y., Saino O., Takeuchi Y., Ogawa Y., Kimura T., Gul S., Claussen C., Boltze J., Taguchi A. 2021. Gap junction-mediated cell-cell interaction between transplanted mesenchymal stem cells and vascular endothelium in stroke. *Stem Cells*. **39** (7), 904–912.
18. Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Sukhikh G.T. 2013. Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* **156** (1), 119–121.
19. Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Bobkova N.V., Alexandrova M.A., Sukhikh G.T. 2020. Effect of transplantation of neural stem and progenitor cells on memory in animals with Alzheimer's type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* **168** (4), 589–596.
20. Skok M. 2021. Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool to cure cognitive impairment caused by neuroinflammation. *World J. Stem Cells*. **13** (8), 1072–1083.
21. Yun H.M., Kim H.S., Park K.R., Shin J.M., Kang A.R., il Lee K., Song S., Kim Y.B., Han S.B., Chung H.M., Hong J.T. 2013. Placenta-derived mesenchymal stem cells improve memory dysfunction in an Aβ1-42-infused mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* **4** (12), e958.
22. Bagheri-Mohammadi S. 2021. Microglia in Alzheimer's disease: The role of stem cell-microglia interaction in brain homeostasis. *Neurochem. Res.* **46** (2), 141–148.
23. Qin C., Lu Y., Wang K., Bai L., Shi G., Huang Y., Li Y. 2020. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive deficits and alleviates

- neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: A meta-analytic review on potential mechanisms. *Transl. Neurodegener.* **9** (1), 20.
24. Yang H., Xie Z., Wei L., Yang H., Yang S., Zhu Z., Wang P., Zhao C., Bi J. 2013. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an A β PP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Res. Ther.* **4** (4), 76.
 25. Hernández A.E., García E. 2021. Mesenchymal stem cell therapy for Alzheimer's disease. *Stem Cells Int.* **2021**, e7834421.
 26. de Godoy M.A., Saraiva L.M., de Carvalho L.R.P., Vasconcelos-Dos-Santos A., Beiral H.J.V., Ramos A.B., Silva L.R.P., Leal R.B., Monteiro V.H.S., Braga C.V., de Araujo-Silva C.A., Sinis L.C., Bodart-Santos V., Kasai-Brunswick T.H., Alcantara C.L., Lima A.P.C.A., da Cunha-E Silva N.L., Galina A., Vieyra A., De Felice F.G., Mendez-Otero R., Ferreira S.T. 2018. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *J. Biol. Chem.* **293** (6), 1957–1975.
 27. Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., Ustyugov A.A., Polyakov D.N., Eliseeva I.A., Kretov D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. 2015. The Y-box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models. *PLoS One.* **10** (9), e0138867.
 28. Evgenov M., Bobkova N., Krasnov G., Garbuz D., Funikov S., Kudryavtseva A., Kulikov A., Samokhin A., Maltsev A., Nesterova I. 2019. The effect of human HSP70 administration on a mouse model of Alzheimer's disease strongly depends on transgenicity and Age. *J. Alzheimer's Dis.* **67**, 1391–1404.
 29. Miao X., Wu Y., Wang Y., Zhu X., Yin H., He Y., Li C., Liu Y., Lu X., Chen Y., Shen R., Xu X., He S. 2016. Y-box-binding protein-1 (YB-1) promotes cell proliferation, adhesion and drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Exp. Cell Res.* **346** (2), 157–166.
 30. Xie F., Zhan R., Yan L.-C., Gong J.-B., Zhao Y., Ma J., Qian L.-J. 2016. Diet-induced elevation of circulating HSP70 may trigger cell adhesion and promote the development of atherosclerosis in rats. *Cell Stress Chaperones.* **21** (5), 907–914.
 31. Galipeau J., Krampera M., Barrett J., Dazzi F., Deans R.J., DeBruijn J., Dominici M., Fibbe W.E., Gee A.P., Gimble J.M., Hematti P., Koh M.B., LeBlanc K., Martin I., McNiece I.K., Mendicino M., Oh S., Ortiz L., Phinney D.G., Planat V., Shi Y., Stroncek D.F., Viswanathan S., Weiss D.J., Sensebe L. 2016. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy.* **18** (2), 151–159.
 32. Wang Y., Su J., Fu D., Wang Y., Chen Y., Chen R., Qin G., Zuo J., Yue D. 2018. The role of YB1 in renal cell carcinoma cell adhesion. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 1304–1311.
 33. Kollar K., Cook M.M., Atkinson K., Brooke G. 2009. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *Int. J. Cell Biol.* **2009**, e904682.
 34. Tang B., Li X., Liu Y., Chen X., Li X., Chu Y., Zhu H., Liu W., Xu F., Zhou F., Zhang Y. 2018. The therapeutic effect of ICAM-1-overexpressing mesenchymal stem cells on acute Graft-Versus-Host disease. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **46** (6), 2624–2635.
 35. Tatarnikova O.G., Orlov M.A., Bobkova N.V. 2015. Beta-amyloid and tau-protein: structure, interaction, and prion-like properties. *Biochemistry. (Mosc).* **80** (13), 1800–1819.
 36. Sukach A.N., Ivanov E.N. 2007. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell tissue biol.* **1** (6), 476–481.
 37. Onfelt B., Nedvetzki S., Benninger R.K., Purbhoo M.A., Sowinski S., Hume A.N., Seabra M.C., Neil M.A., French P.M., Davis D.M. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J. Immunol.* **177** (12), 8476–8483.

Interaction of Mesenchymal Stromal Cells with Primary 5XFAD Mice Hippocampus Culture Depending on Cocultivation Method

A. V. Chaplygina^{1,*}, D. Y. Zhdanova¹, V. I. Kovalev¹, R. A. Poltavtseva², N. V. Bobkova¹

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

²National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: shadowhao@yandex.ru

In this work we studied the mutual influence of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) isolated from Wharton's jelly of human umbilical cord and primary culture of hippocampal cells obtained from transgenic mice 5XFAD, used as an animal model of inherited form of Alzheimer's disease (AD). Experimental protocols included both direct and indirect co-cultivation of MMSCs with hippocampal cells from transgenic animals. It was shown that in the conditions of indirect co-culture, the aggressive environment of cultured transgenic cells significantly decreases the survival rate and adhesiveness of MMSCs. However,

preliminary priming of MMSCs with proteins YB-1 and HSP70 improved the survival and adhesive properties of MMSCs. It was also found that the interactions of MMSCs with cultured hippocampal cells depend on cell culture age. Old cultures of transgenic cells induced differentiation of MMSC into astrocytes, both during direct and indirect co-cultivation. In contrast, in young cultures of transgenic cells, during contact co-cultivation, MMSCs played the role of specific strands that promoted clustering of hippocampal cells in the culture and the formation of neurospheres. The interaction between MMSCs and neural cells occurred through gap junctions and nanotubes. Our findings expand the understanding of interactions between MMSCs and recipient cells, which allows us to revise the conditions of cellular transplantation therapy for pathological processes in the brain of AD patients.

Keywords: transgenic mice 5XFAD, mesenchymal stromal cells, primary neuronal culture, hippocampal cell culture, cell therapy