

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru

Тематический выпуск
«Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 5, 2023

Тематический выпуск “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”

Редактор-составитель В. П. Зинченко

Рецепторы и внутриклеточная сигнализация 2023 г. Итоги конференции <i>В. П. Зинченко</i>	305
---	-----

ОБЗОРЫ

Роль оксида азота и сероводорода в гибели нейронов и глиальных клеток при нейродегенеративных процессах <i>С. В. Родькин, Ч. Д. Нвосу</i>	306
Современные тенденции применения стволовых клеток и их производных при криоконсервации спермы животных <i>М. А. Тамбовский, А. М. Аймалетдинов, Е. Ю. Закирова</i>	328

Влияние предшественника синтеза серотонина 5-окситриптофана на ВПСП, регистрируемые в премоторных интернейронах виноградной улитки при формировании условного оборонительного рефлекса <i>А. И. Арсланов, Д. И. Силантьева, В. В. Андрианов, И. Б. Дерябина, Х. Л. Гайнутдинов</i>	336
Оценка токсического действия 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазина по дыхательной активности лимфоцитов <i>П. В. Ильясов, Л. В. Лимарева, А. И. Сизова, В. А. Заломленков, А. П. Курицына</i>	342
Исследование спектральных характеристик поверхности растительной клетки: присутствие азуленов и биогенных аминов <i>В. В. Рощина, В. А. Яшин, А. Р. Куньев</i>	351
Анализ роли каналов Piezo1 в механоанаболическом сопряжении в камбаловидной мышце крысы <i>К. В. Сергеева, С. А. Тыганов, В. Е. Калашников, Б. С. Шенкман, Т. М. Мирзоев</i>	362
Влияние половых гормонов на белок транспортер ABCG2 в клетках линии Сасо-2 <i>А. А. Слепнев, Ю. В. Абаленихина, Н. М. Попова, А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева</i>	370
Этилметилгидроксипиридина сукцинат ограничивает стресс-индуцированное нейровоспаление в коре головного мозга старых крыс <i>О. Л. Терехина, Ю. И. Кирова</i>	379
Исследование механизма угнетающего действия гамма-аминомасляной кислоты на процесс образования миотрубок в культуре <i>А. Р. Токмакова, Г. В. Сибгатуллина, К. Р. Гилиждинова, А. И. Маломуж</i>	388
Участие митохондриальной Ca ²⁺ -независимой фосфолипазы iPLA2 в индукции митохондриальной поры длинноцепочечными ацилкарнитинами <i>Н. И. Федотчева, Е. В. Гришина, В. В. Дынник</i>	396
Изучение влияния хорионического гонадотропина человека на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток <i>К. Ю. Шардина, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, С. В. Ужвиюк, С. А. Заморина</i>	404

Contents

Vol. 40, No. 5, 2023

Special Issue *Receptors and Intracellular signaling*

Publication editor, V. P. Zinchenko

Receptors and intracellular signaling 2023. Conference overview

V. P. Zinchenko

305

REVIEWS

Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Neuronal and Glial Cell Death in Neurodegenerative Processes

S. V. Rodkin, C. D. Nwosu

306

Modern Trends of the Application of Stem Cells and Their Derivatives during Cryopreservation of Animal Sperm

M. A. Tambovsky, A. M. Aimaletdinov, E. Yu. Zakirova

328

Action of Serotonin Precursor Synthesis 5-Oxytryptophan on EPSP Recorded in Premotor Interneurons of Snail after Formation of Conditioned Defensive Reflex

A. I. Arslanov, D. I. Silantyeva, V. V. Andrianov, I. B. Deryabina, Kh. L. Gainutdinov

336

Assessment of the Toxic Effect of 2-(Chlorodinitromethyl)-4-Methoxy-6-(4-Methylpiperazine-1-yl)-1,3,5-Triazine by Respiratory Activity of Lymphocytes

P. V. Iliasov, L. V. Limareva, A. I. Sizova, V. A. Zalomlenkov, A. P. Kuricyna

342

Spectral Characteristics of the Plant Cell Surface: Occurrence of Azulenes and Biogenic Amines

V. V. Roshchina, V. A. Yashin, A. R. Kunyev

351

Analysis of the Role of Piezo1 Channels in Mechano-Anabolic Coupling in Rat Soleus Muscle

K. V. Sergeeva, S. A. Tyganov, V. E. Kalashnikov, B. S. Shenkman, T. M. Mirzoev

362

Influence of Sex Hormones on the ABCG2 Transport Protein in Caco-2 Cells

A. A. Slepnev, Yu. V. Abalenikhina, N. M. Popova, A. V. Shchulkin, E. N. Yakusheva

370

Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Limits Stress-Induced Neuroinflammation in the Cerebral Cortex of Old Rats

O. L. Terekhina, Y. I. Kirova

379

The Study of the Mechanism of Gamma-Aminobutyric Acid Inhibitory Effect on the Myotube Formation Process in Cell Culture

A. R. Tokmakova, G. V. Sibgatullina, K. R. Gilizhdinova, A. I. Malomouzh

388

Involvement of the Mitochondrial Ca²⁺-Independent Phospholipase iPLA2 in the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Long-Chain Acylcarnitines

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

396

Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Differentiation and Functional Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells

K. Yu. Shardina, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, S. V. Uzhviyuk, S. A. Zamorina

404

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ 2023 г. ИТОГИ КОНФЕРЕНЦИИ

DOI: 10.31857/S0233475523050146, EDN: VQLFTY

22–26 мая 2023 г. в Пушкино на базе Института биофизики клетки Российской академии наук Федерального исследовательского центра ПНЦБИ РАН проходила 12-я Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”. Подробно программу и материалы конференции можно найти на сайте <http://www.cellsignal.ucoz.org/>.

В работе конференции приняли участие 152 человека, которые представляли 32 организации из 16 городов и 5 стран, включая Россию, Беларусь, Казахстан, Узбекистан и Великобританию. На конференции был представлен 71 устный доклад (из них 5 пленарных) и 65 постерных сообщений.

Программа конференции традиционно включала такие проблематики, как кальциевая сигнализация и сигнализация с участием ионотропных рецепторов в синапсе; особенности сигнализации в мышечных клетках и нейронах, в стволовых и опухолевых клетках; трансдукция в сенсорных клетках, сигнализация при апоптозе, в условиях стресса и при повреждении митохондрий; активные формы кислорода и редокс-системы в передаче сигналов; механизмы межклеточных коммуникаций; фармакологические мишени в системе внутриклеточной сигнализации; новые клеточные модели различных заболеваний и методы коррекции патологических состояний.

На конференции были представлены доклады ведущих ученых, посвященные как фундаментальным механизмам функционирования клеток при различных патологиях, так и последним достижениям биотехнологии, фармакологии и экспериментальной медицины. Большой интерес вызвали доклады: *В.П. Зинченко* об участии кальций-проводящих АМРА-рецепторов в регуляции гипервозбуждения нейронов мозга; *О.А. Рогачевской* о механизме секреции АТР во вкусовой почке; *И.В. Миндукшева* об участии тромбоцитов в системе свертывания крови; *В.И. Чечехина* о чувствительности клеток к норадреналину при развитии артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением; *Б.С. Шенкмана* о сигнальных процессах в мышцах при переходе от активности к бездействию; *Н.В. Белослудцевой* об участии мегаканала VDAC1 в развитии митохондриальной дисфункции при гипергликемии; *Н.В. Гончарова* об ингибиторах эстераз в токсикологии и фармакологии; *Е.Н. Кислухина* об использовании широкопольной оптической нейровизуализации для

прижизненной регистрации фокальной ишемии; *Д.Н. Силачева* о перспективе использования внеклеточных везикул для диагностики и лечения заболеваний; *Е.Ю. Плотникова* о новой модели фокальной ишемии почки. В конкурсе постерных докладов молодых ученых первое место заняла работа *О.А. Стельмащук* “Фармакологическая активация транскрипционного фактора Nrf2 в астроцитах”.

На конференции широко обсуждались молекулярные механизмы управления функциональной активностью клеток в норме и при различных патологиях. В частности, представлены данные о новых рецептор-зависимых механизмах регуляции активности тромбоцитов. Традиционно много работ было посвящено исследованиям сигнализации в клетках мозга, сердца и почек при апоптозе в условиях стресса и ишемии. Приведены данные о механизмах повреждения и защиты клеток от гибели. Конференция показала возросший вклад молодых ученых в исследования патологических процессов в различных тканях при ишемии, гипертензии, гипергликемии, токсикологии и тромбообразовании. По-прежнему актуальны проблемы контроля гипервозбуждения и торможения в нейрональной сети, нейроглиальные взаимодействия в мозге и механизмы активации защитных эндогенных сигнальных путей нейронов мозга при нейродегенерации.

Конференция показала, что механизмы управления функциональной активностью клеток и сегодня находятся в центре внимания исследователей, работающих в разных областях биологии и медицины. Большинство работ, представленных на конференции, были поддержаны Российским научным фондом. Существенная поддержка в проведении конференции была оказана такими известными фирмами, работающими на рынке научного оборудования и реактивов, как БиоПик, ДИА-М, ХИММЕД, представители которых организовали выставку оборудования и выступили с рекламными докладами.

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

Председатель Оргкомитета конференции
В. П. Зинченко

УДК 576.3+576.32/36

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2023 г. С. В. Родькин^а, *, Ч. Д. Нвосу^а

^аДонской государственный технический университет, факультет “Биоинженерия и ветеринарная медицина”, кафедра “Биоинженерия”, Ростов-на-Дону, 344000 Россия

*e-mail: rodkin_stas@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Нейродегенерация – сложный прогрессирующий патологический процесс, ведущий к гибели нейронов, который индуцируется различными внешними и внутренними факторами. Нейродегенеративные заболевания, травмы центральной и периферической нервной системы, психические расстройства и ряд других патологических состояний, сопровождаются функционально-структурной деградацией нейронов и их гибелью и являются серьезной проблемой мировой системы здравоохранения, от которой ежегодно становятся инвалидами либо умирают миллионы людей на всей планете. Ситуация осложняется отсутствием селективных клинически эффективных нейропротекторных препаратов. Было показано, что оксид азота (NO) и сероводород (H₂S) активно участвуют в нейродегенерации и клеточной гибели нейронов и глии, однако их роль до конца неясна. В настоящем обзоре рассмотрены NO- и H₂S-зависимые сигнальные механизмы, лежащие в основе патогенеза нейродегенеративных процессов. Рассмотрены перспективы дальнейших исследований роли NO и H₂S в нервной ткани в условиях патологических состояний, связанных с нейродегенерацией.

Ключевые слова: оксид азота, сероводород, нейродегенерация, нейрон, глиальные клетки, окислительный стресс, апоптоз, аутофагия, аксотомия

DOI: 10.31857/S0233475523050067, **EDN:** OMAVEN

ПРОБЛЕМА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Нейродегенерация – сложный прогрессирующий патологический процесс, заключающийся в функционально-структурной деградации нервных клеток, который развивается в результате различных факторов, например, травматического повреждения нервной ткани, ряда инфекционных заболеваний, неблагоприятного воздействия окружающей среды, психических и нейродегенеративных заболеваний и т.д. Стоит отметить, что термин “нейродегенеративные заболевания” является лишь частью общего понятия нейродегенерация [1, 2]. Например, при нейротравмах наблюдается деградация нейронов и окружающих глиальных клеток [3–5]. Ряд психических патологий характеризуется атрофическими изменениями коры больших полушарий [2, 6].

Многие работы повествуют о роли таких газотрансмиттеров, как оксид азота (NO) и сероводород (H₂S), в этиологии и патогенезе различных нейродегенеративных процессов. Однако их участие часто носит противоречивый характер и до конца не изучено, что делает данную область ис-

следования особенно актуальной и перспективной. Особый интерес представляет NO- и H₂S-зависимые сигнальные механизмы регуляции процессов деградации аксонов, дендритов, синапсов, нарушения фолдинга белков и митохондриальной дисфункции в нейронах [7–15]. Эти нейропатологические процессы часто приводят к активации программируемой клеточной гибели по типу апоптоза, аутофагии, ферроптоза и пироптоза, в которых также участвуют представленные выше газотрансмиттеры [16–23]. Новые результаты позволят лучше понять молекулярно-клеточные механизмы, реализуемые NO и H₂S, лежащие в основе выживания и гибели нейронов и глии при различных факторах, индуцирующих нейродегенерацию, а также будут способствовать разработке газотрансмиттер-ассоциированных нейропротекторных препаратов нового поколения и более совершенных стратегий терапевтического лечения.

В связи с этим целью настоящего обзора является анализ современных источников, указывающих на основную роль NO и H₂S в молекулярно-клеточных событиях при нейродегенерации и клеточной гибели нейронов и окружающих глиальных клеток при этом патологическом процес-

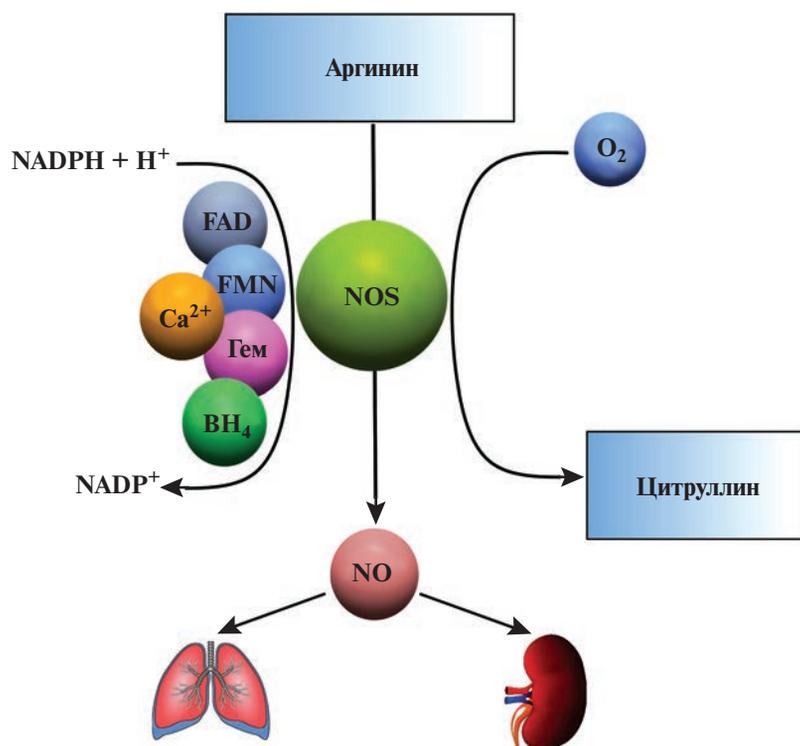


Рис. 1. Схема биосинтеза и катаболизма NO (с изменениями по Rodkin et al., 2023 [54]). NO образуется путем окисления O_2 гуанидиновой группы аргинина NOS с образованием цитруллина и NO – реакция монооксигеназного типа. Для активации конститутивных NOS необходим Ca^{2+} . Для работы NOS нужны коферменты и простетические группы: NADPH, FAD, FMN, BH_4 и гем. Выводятся NO и его метаболиты в основном через почки, также возможен путь через легкие.

се. Опираясь в том числе и на результаты, которые были получены нашим научным коллективом, мы постараемся наиболее полно и детально представить многогранную роль данных газотрансмиттеров в общем аспекте этого патологического процесса, и в частности, при травмах периферической нервной системы. Также мы затронем вопросы, касающиеся применения доноров NO и H_2S и ингибиторов ферментов, ответственных за их синтез, в качестве нейропротекторов.

ГАЗОТРАНСМИТТЕРЫ: ОКСИД АЗОТА И СЕРОВОДОРОД

Газотрансмиттеры – сигнальные молекулы газов, синтезирующиеся эндогенно и выполняющие в организме множество функций в норме и при патологических состояниях. Данный класс сигнальных молекул является малыми молекулами, которые легко проникают через биологические мембраны и взаимодействуют с большим количеством вне- и внутриклеточных мишеней. Особый интерес представляют газотрансмиттеры NO и H_2S , которые принимают активное участие в разнообразных процессах в организме, включая нейродегенеративные процессы, связанные с клеточной гибелью нейронов и глиальных клеток. Две

противоположности в окислительно-восстановительном потенциале: NO, обладающий свойствами сильного окислителя, и H_2S , мощный восстановитель, могут находиться в оппозиции по своим биологическим эффектам и реализовать обилие молекулярно-клеточные сигнальные механизмы [24]. Однако многие научные данные о роли NO и H_2S в нейродегенерации и клеточной гибели нейронов и глиальных клеток носят довольно противоречивый характер, хотя стоит отметить, что чаша весов склоняется в сторону нейропротекции относительно H_2S , и наоборот, в сторону нейродегенерации – относительно NO.

Оксид азота: биосинтез, депонирование, катаболизм

Эпоху газотрансмиттеров, как новых сигнальных молекул, венчает NO, когда в 1986 году Р. Фарчготт установил, что фактором релаксации сосудов является NO [25]. Однако этому открытию предшествовало не менее значимое – в 1965 году А.Ф. Ванин с помощью электронного парамагнитного резонанса обнаружил неизвестный радикал в дрожжевых клетках *S. cerevisiae* и пришел к выводу, что он относится к NO [24].

Физиологическая внутриклеточная концентрация NO может колебаться в диапазоне 100 пМ – 5 мМ. Однако ранее эта величина устанавливалась около 1 мкМ, что, вероятно, было связано с несовершенством методов для его определения. Стоит также отметить, что уровень NO во многом определяется тканеспецифичностью и клеточной специфичностью, в которой он синтезируется. Даже в нервной ткани в зависимости от локализации разброс может быть довольно большим. При нейропатологических процессах внутриклеточная концентрация NO может значительно изменяться [26].

NO ответственен за разнообразные биологические эффекты, например, расслабление гладких мышц сосудов, нейтрализацию патогенных агентов, нейротрансмиссию, противоопухолевую активность и др. Известны, многочисленны типы клеток, продуцирующие данный газотрансмиттер. Биосинтез NO происходит под действием ферментов NO-синтаз (NOS) путем окисления гуанидиновой группы *L*-аргинина ($\alpha 1$). На сегодняшний день идентифицировано несколько изоформ NOS: нейрональная (nNOS/NOS1), эндотелиальная (eNOS/NOS3), индуцибельная (iNOS/NOS2) и митохондриальная (mtNOS/NOS4) [27, 28]. Структурно-функциональная организация mtNOS пока нечетко идентифицирована [29]. Активация nNOS и eNOS происходит по Ca^{2+} /CaM-зависимому пути, также их пул постоянно присутствует в клетке – они являются конститутивным типом NOS. В отличие от них iNOS экспрессируется в ответ на стресс-реакции в течение нескольких часов и активируется по Ca^{2+} -независимому механизму. В активном состоянии NOS – гомодимерный комплекс. Мономерная структура NOS состоит из оксигеназного домена на N-конце и редуктазного на C-конце полипептидной цепи [27, 30].

NO способен образовывать стабильные соединения и депонироваться в клетках, а также транспортироваться внеклеточно на большие расстояния. S-нитрозотиолы (RSNO) и динитрозильные комплексы железа (DNICs) являются основными депо NO, которые могут влиять на многие процессы в организме [31].

Функции оксида азота в нервной ткани

Нейроны, экспрессирующие NO, широко представлены в центральной (ЦНС) и периферической нервной системе (ПНС). Функции NO в нервной ткани разнообразны: терморегуляция, обоняние, ноцицепторная чувствительность, координация, память, обучение, синаптическая пластичность, нейротрансмиссия и т.д. [32]. При этом в зависимости от локализации NOS в том или ином отделе нервной системы различаются и

функции, выполняемые NO. Так, например, в коре мозжечка NO контролирует функциональную гиперемия [33]. Данный газотрансмиттер контролирует высвобождение норадреналина из голубого пятна [34]. NO регулирует cGMP-зависимые протеинкиназы, которые широко экспрессируются в нервной ткани, например, в таламусе [35]. Было показано, NO может регулировать дофамин-стимулированную выработку циклического аденозинмонофосфата (сAMP) через активацию cGMP/PDE2A [36]. Недавние работы показали, что NO широко представлен в афферентных структурах головного мозга и участвует в барорецепции, изменении кровяного давления, тонуса сосудов. Показано, что NO ингибирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [37].

Регуляция синаптической пластичности NO может осуществляться через хорошо известный сигнальный путь NO/GC/cGMP/протеинкиназа G (PKG), в котором NO связывается с гемовым Fe^{2+} гуанилатциклазы (GC) и приводит к ее активации. GC рассматривается, как классическая мишень NO. В результате чего генерируется cGMP, запускающий различные сигнальные механизмы. Стоит отметить, классический сигнальный путь NO в нервной системе заключается в связывании глутамата с NMDA-рецепторами (NMDAR) постсинаптической мембраны, что приводит к активации nNOS и синтезу NO. В результате активируется сигнальный путь NO/GC/cGMP/PKG. При этом PKG фосфорилирует Ca^{2+} -каналы на пресинаптической мембране, замыкая глутамат/NMDA-рецептор/NO-каскад, так как деполяризация пресинаптической мембраны приводит к высвобождению глутамата в межсинаптическое пространство [38]. Кроме этого, NO может регулировать экспрессию белков, связанных с синаптической пластичностью [39], включая механизмы нитрозилирования [40]. NO влияет на транспорт AMPA-рецепторов (AMPA), являющихся ключевыми рецепторами синаптической передачи [41].

NO участвует в процессах формирования памяти и обучения. Указывается, что в этом процессе участвует NO, синтезируемый в латеральной миндалине [42], префронтальной коре [43] и т.д. В поведенческих экспериментах на улитке *Helix lucorum* было показано, что NO участвует в консолидации памяти [44]. NO может связываться гемовой группой HRI (heme-regulated eukaryotic initiation factor eIF2 α kinase) [45], участвующей в процессах распознавания предметов [46].

Данный газотрансмиттер может модулировать двигательное поведение, регулируя дофаминергическую, серотонинергическую и холинергическую нейротрансмиссии в полосатом теле [47]. NO играет важную роль в развитии и функциони-

ровании мозжечка, регулируя пластичность в синапсах нейронов Пуркинье [48].

В ПНС NO может контролировать высвобождение медиаторов, работу ионных каналов, изменять уровень вторичных посредников и влиять на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул [37]. На периферии многие гладкомышечные ткани иннервируются нитроэргическими нервами, в которых обнаруживается высокий уровень nNOS [27, 37]. Предполагается, что синтезируемый NO в этих нервах стимулирует NO-чувствительную GC в эффекторных клетках [38].

Нарушение NO-зависимых сигнальных путей лежит в основе патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний, психических расстройств и нейротравм различного генеза.

*Сероводород: биосинтез,
депонирование, катаболизм*

В 1996 году был открыт эндогенный синтез H₂S в нервной ткани головного мозга. Реакция осуществлялась с помощью фермента цистатионин-β-синтазы. В результате была постулирована его роль в нейромодуляции [49, 50]. Данный мессенджер существует в клетке в виде газообразных молекул либо бисульфидата натрия. H₂S депонируется в виде сульфгемоглобина, а также в комплексе белков, содержащих комплекс железо–сера, и сульфана-серного депо, который включает гидродисульфиды/перисульфиды [51].

Концентрация сульфидов в нервной ткани млекопитающих колеблется в пределах в 50–160 мкМ, что говорит о важной роли эндогенного H₂S в организме [52]. Сообщается, что концентрация свободного H₂S составляет 30–100 мкМ во всех тканях. Однако есть исследования демонстрирующие, что уровень несвязанного H₂S на самом деле колеблется в районе 15 нМ [53]. При этом уровень H₂S сильно изменяется при различных патологических состояниях. Обычно при нейродегенеративных процессах наблюдается уменьшение концентрации H₂S в нейронах и глиальных клетках [19, 54].

L-Цистеин и цистин являются основными источниками H₂S в организме. На сегодняшний день известно, как минимум, три фермента, под влиянием которых происходит синтез H₂S: цистатионин-β-синтаза (CBS), цистатионин γ-лиаза (CSE) и 3-меркаптопируват сульфуртрансфераза (MST) в комплексе с цистеинаминотрансферазой (CAT) (рис. 2) [30, 50, 55].

CBS состоит из 4 субъединиц, которые включают три домена. N-концевой домен необходим для связывания гемом кофактора. Каталитический домен имеет сайт связывания для пиридоксальфосфата (PLP). С-концевой регуляторный

домен содержит две области (CBS1 и CBS2), ответственные за димеризацию. CBS преимущественно экспрессируется в головном мозге, а также в ряде других органов. В основном локализован в цитоплазме, но может транслоцироваться в ядро и митохондрии [56, 57].

CSE может действовать в тримерной либо тетрамерной форме. Мономер CSE состоит из двух доменов: большого N-концевой домена, связывающего пиридоксальфосфат (PLP), и малого С-концевого домена. CBS и CSE участвуют в одном пути транссульфурации, являющегося основным источником эндогенного цистеина и H₂S [58].

Катаболизм H₂S осуществляется через окисление и метилирование. Окисление H₂S в основном протекает в митохондриях до сульфата с промежуточными продуктами: перисульфидом (RSSH), сульфитом (SO₃²⁻) и тиосульфатом (S₂O₃²⁻). В результате основная часть H₂S выводится с мочой в форме сульфата. Стоит отметить, что в головном мозге существует дефект окисления сульфидов. Так, при введении доноров H₂S его окисление наблюдалось максимально в печени, сердце и почках, но не в нервной ткани головного мозга. Поэтому вопрос об окислительном пути катаболизма H₂S в нейронах остается открытым [51, 59].

Метилирование H₂S происходит в цитоплазме до диметилсеры. Метилирование H₂S протекает значительно медленнее его окисления, поэтому не является основным путем катаболизма H₂S [60]. Также H₂S может выделяться через легочную ткань (рис. 2) [51].

Функции сероводорода в нервной ткани

H₂S выполняет в нервной ткани большое количество различных функций. Было установлено, что H₂S усиливает долговременную потенциацию в гиппокампе через активацию NMDA-рецептора, что влияет на процессы обучения и памяти [61, 62]. В нейронах H₂S участвует в синтезе cAMP, активируя аденилатциклазу (AC) [50]. H₂S играет важную роль в процессах нейрогенеза и посттравматической регенерации через активацию различных сигнальных путей. Данный газотрансмиттер способствует пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток [63]. В частности, H₂S может усиливать нейрогенез при повреждении нервной системы через ингибирование сигнального пути IRAK-1/GSK3β/AKT и усиления экспрессии Nestin, GFAP, IL-6, NeuN, TUJ-1, MAP-2 и BDNF [64]. Кроме этого, H₂S регулирует уровень ряда нейротрофических факторов в норме и при патологических состояниях [65, 66].

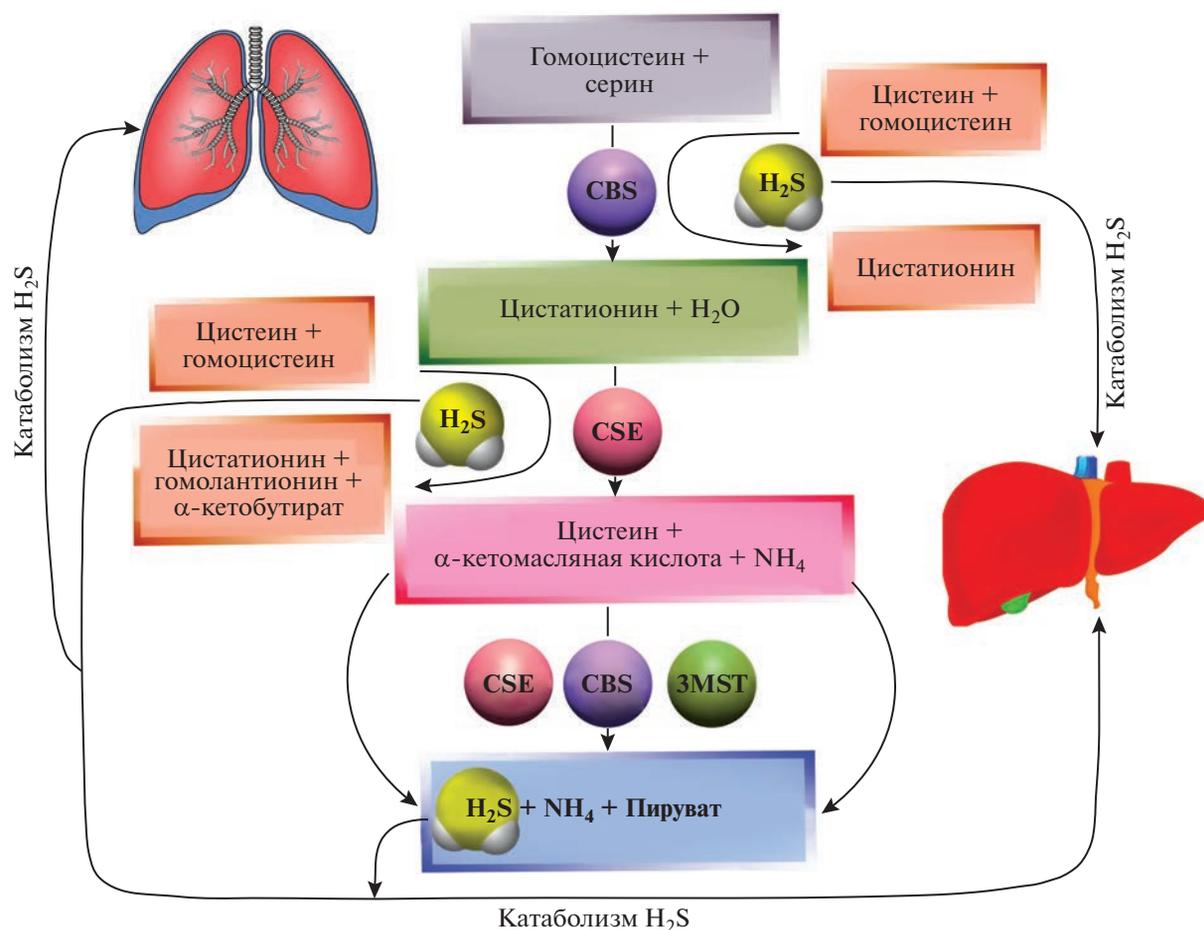


Рис. 2. Схема биосинтеза и катаболизма H₂S. В образовании H₂S участвует три фермента: цистатионин-β-синтаза (CBS), цистатионин γ-лиаза (CSE) и 3-меркаптопируват сульфуртрансфераза (MST). Синтезированные H₂S подвергается катаболизму в печени путем окисления и метилирования и выводится с мочой через почки. Также удаляется H₂S может путем выдоха через легкие.

H₂S участвует в процессах возбуждения и торможения в головном мозге. Известно, что H₂S модулирует активность АТР-зависимых K⁺-каналов (КАТР-каналы). Их активация приводит к гиперполяризации, снижению возбудимости и угнетению нейронов. Так, например, в дорзальном ядре шва, гиппокампе и гипоталамусе H₂S участвует в гиперполяризации нейронов, увеличивая приток K⁺ через КАТР-каналы. H₂S может повышать уровень рецепторов γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) на пресинаптических и постсинаптических клеточных мембранах [67].

Было показано, что данный газотрансмиттер вызывает выход Ca²⁺ из внутриклеточных депо и Ca²⁺-волны в астроцитах и нейронах гиппокампа. H₂S может увеличивать внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ путем активации Ca²⁺-каналов L-типа в нейронах мозжечка. В ядре одиночного тракта H₂S также вызывает увеличение импульсной активности по Ca²⁺-зависимому пути. Ин-

гибирование CBS приводит к снижению величины синаптических токов и цитоплазматического Ca²⁺ [68].

H₂S непосредственно участвует в регуляции уровней нейромедиаторов в ЦНС и ПНС в норме и при патологических состояниях. Так, было показано, что доноры H₂S повышают уровень серотонина в полосатом теле и модулируют баланс между ГАМК и глутаматом в моделях болезни Паркинсона у грызунов [69]. В недавнем исследовании на трансгенных *C. elegans* было обнаружено, что H₂S значительно повышает уровень дофамина [70]. H₂S участвует в регуляции гипоталамо-гипофизарной системы, в частности, в выбросе кортикотропин-релизинг гормона [68].

В ПНС H₂S может стимулировать капсаицин-чувствительные нервные окончания, индуцируя высвобождение вещества P и нейрокина А [68]. Также H₂S усиливает высвобождение медиатора и контролирует процессы экзо- и эндоцитоза си-

наптических везикул в двигательных нервных окончаниях [71, 72].

H₂S участвует в процессах восстановления гематоэнцефалического барьера [73] и уменьшает отек головного мозга [19]. H₂S уменьшает ранние повреждения головного мозга, повышает моторную функцию и уменьшает корковые нарушения после травматического повреждения нейронов [74].

Изменение уровня и нарушение метаболизма H₂S было зафиксировано при развитии нейродегенеративных заболеваний, например, при болезни Альцгеймера и Паркинсона [75], травматических повреждениях нервной системы [76], ряда психических расстройств [77], инсульте [78] и т.д.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

Нейровоспаление и окислительный стресс

Нейровоспаление – это воспалительная реакция в нервной ткани, при которой происходит активация глиальных клеток, рекрутирование нейтрофилов и макрофагов, значительное увеличение цитокинов, хемокинов, интенсификация свободнорадикальных процессов и т.д. [79, 80]. В свою очередь, окислительный стресс развивается в результате нарушения динамического равновесия между оксидантной/антиоксидантной системой в сторону чрезмерного повышения свободнорадикального окисления [81].

Нейровоспалительная реакция и окислительный стресс характерны для многих нейродегенеративных процессов [54, 82, 83]. При этих патологических процессах происходит потеря пре- и постсинаптических белков, деградация синапсов [54], аксонов [84], дендритов [85], развивается митохондриальная дисфункция [86] и ряд других функционально-деструктивных изменений нейронов.

NO и H₂S играют одну из ключевых ролей в нейровоспалении и окислительном стрессе. Повышенная продукция NO увеличивает адгезию лейкоцитов к эндотелию кровеносных сосудов [87], их проницаемость [88] и миграцию лейкоцитов во внеклеточное пространство [89]. Однако базовый уровень NO, наоборот, ингибирует адгезию лейкоцитов [87]. NO может усиливать воспаление путем увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов [90]. H₂S может снижать нейровоспаление через ингибирование окислительного стресса, NF-κB, адгезию лейкоцитов к эндотелию, фактора некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor), интерлейкина-1 β (IL-1 β) (рис. 3) [74]. Данный газотрансмиттер может снижать уровень iNOS путем активации гемоксигеназы (HO-1) в макрофагах [91], а также повышать продукцию eNOS в эндотелиальных клетках [92].

Стоит отметить, что цитопротекторные и цитотоксические эффекты NO при воспалении и окислительном стрессе во многом определяются синтезирующей его NOS. Считается, что умеренная продукция NO, осуществляющаяся pNOS и eNOS, способна защищать клетки, в то время как активация iNOS, которая генерирует высокий уровень NO, часто ассоциирована с цитотоксическими последствиями [93]. Это связано с тем, что при высокой концентрации NO может взаимодействовать с супероксид анион-радикалом (O₂⁻) с образованием свободного радикала пероксинитрита (ONOO⁻), который обладает высоким цитотоксическим потенциалом. ONOO⁻ нитрирует аминокислоты и окисляет белки, липиды, нуклеиновые кислоты [94]. Эти процессы приводят к увеличению перекисного окисления липидов (ПОЛ), истощению запасов АТФ, нарушению работы Ca²⁺-каналов и митохондрий, деструкции цитоскелета, прогрессированию воспаления, и в конечном итоге к клеточной гибели [95]. Напротив, H₂S повышает уровень внутриклеточного восстановленного глутатиона (GSH), являющегося основным антиоксидантом в клеточной защите от окислительного стресса, а также может регулировать активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и глутатионпероксидазы (GPx) [96]. Кроме этого, H₂S может увеличивать уровень Txn-1 (рис. 3), который представляет собой оксидоредуктазу, выполняющую большое количество функций, включая защиту от окислительного стресса [97].

NO может взаимодействовать с H₂S, образуя крайне реактивное соединение – нитроксил (HNO), который активно взаимодействует с тиоловыми группами белков, инициируя образование дисульфидных связей. Кроме этого, HNO взаимодействует с GSH с образованием дисульфида глутатиона и сульфинамида глутатиона, что в конечном итоге усугубляет окислительный стресс и воспаление [98].

Известно, что NO и ONOO⁻, синтезируемые iNOS, нитрируют бета-амилоид (Aβ) и стимулируют его агрегацию в амилоидные бляшки [83]. Однако дефицит eNOS может способствовать развитию болезни Альцгеймера. Так, у мышей eNOS^{-/-} значительно увеличивались уровни APP, BACE1 и Aβ. Нейропротекторный эффект eNOS, вероятно, связан с улучшением церебрального кровоснабжения через регуляцию sGC/cGMP в гладкомышечных клетках сосудов головного мозга [99]. Повышение уровня iNOS увеличивает гибель нейронов при болезни Альцгеймера [100]. Сообщается, что экспрессия pNOS и iNOS микроглией способствует нейротоксичности при болезни Паркинсона [101]. Напротив, применение доноров H₂S уменьшало уровень BACE1, PS1 через сигнальный путь PI3/Akt и Aβ [102]. Также до-

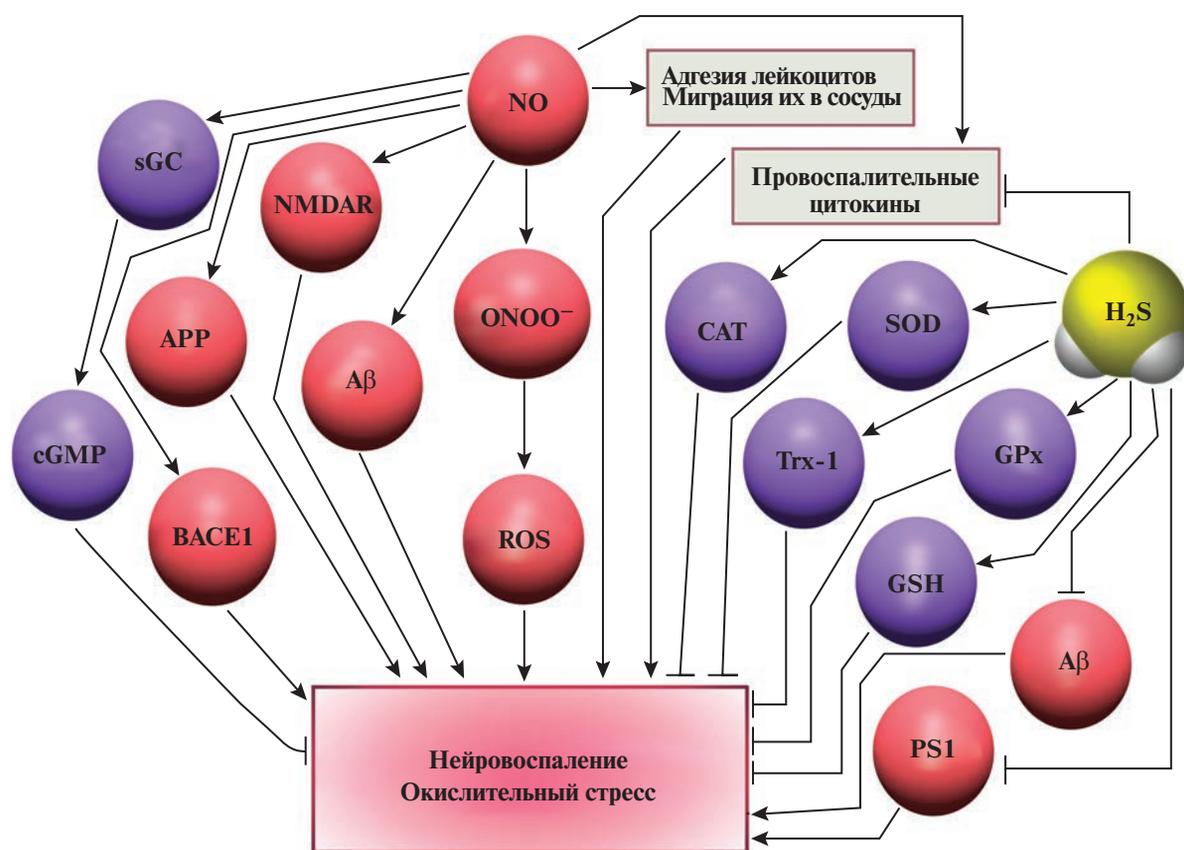


Рис. 3. Схема NO- и H₂S-зависимых сигнальных путей, контролирующих нейровоспаление и окислительный стресс (с изменениями по Rodkin et al., 2023 [54]). Линии с острым концом – положительная регуляция, с тупым концом – отрицательная.

казано, что H₂S, регулируя уровень GSH, обеспечивает антиоксидантную защиту при повреждении головного [103] и спинного мозга [104]. В свою очередь, NO может усиливать окислительный стресс в нервных и глиальных клетках при нейротравмах через активацию NMDA-рецептора и через свободнорадикальные продукты своего метаболизма (рис. 3) [105].

В нашем исследовании в модели фотоокислительного стресса на рецепторе растяжения рака *Astacus leptodactylus*, состоящего из двух нейронов, окруженного оболочкой из сателлитных глиальных клеток, было показано, что происходит мощная генерация NO, как благодаря nNOS, так и, возможно, iNOS, экспрессия которой может носить частично конститутивный характер (рис. 4). Причем за генерацию NO в большей степени были ответственны глиальные клетки, что свидетельствует о важной роли данных NOS в прогрессировании окислительного стресса и клеточной гибели [106].

Таким образом, высокий уровень NO, генерируемый в первую очередь iNOS [93], может приводить к прогрессированию нейровоспаления и окислительного стресса путем усиления адгезии

лейкоцитов к сосудистому эндотелию [87], экспрессии провоспалительных цитокинов [90], ПОЛ, истощению запасов АТФ [95], образования ONOO⁻ [94] и белков, участвующих в нейротоксических эффектах [83] т.д. В свою очередь, H₂S проявляет цитопротекторные свойства через активацию ряда ферментов антиоксидантной защиты [96, 97], повышение уровня GSH [96], ингибирование NF-κB и провоспалительных цитокинов [74], а также может регулировать уровень NO [92].

Нарушение фолдинга белков

Фолдинг белков – это сложный процесс, в результате которого полипептидная цепь достигает своей трехмерной структурной конформации, обретая заверченный структурно-функциональный профиль [107]. В этом процессе активно участвуют белки теплового шока, известные как шапероны, которые помогают приобрести полипептидной цепи нужную пространственную ориентацию [108]. Неправильный фолдинг белков приводит к образованию внутри- и внеклеточных фибриллярных белковых агрегатов, что лежит в основе патогенеза нейродегенеративных заболе-

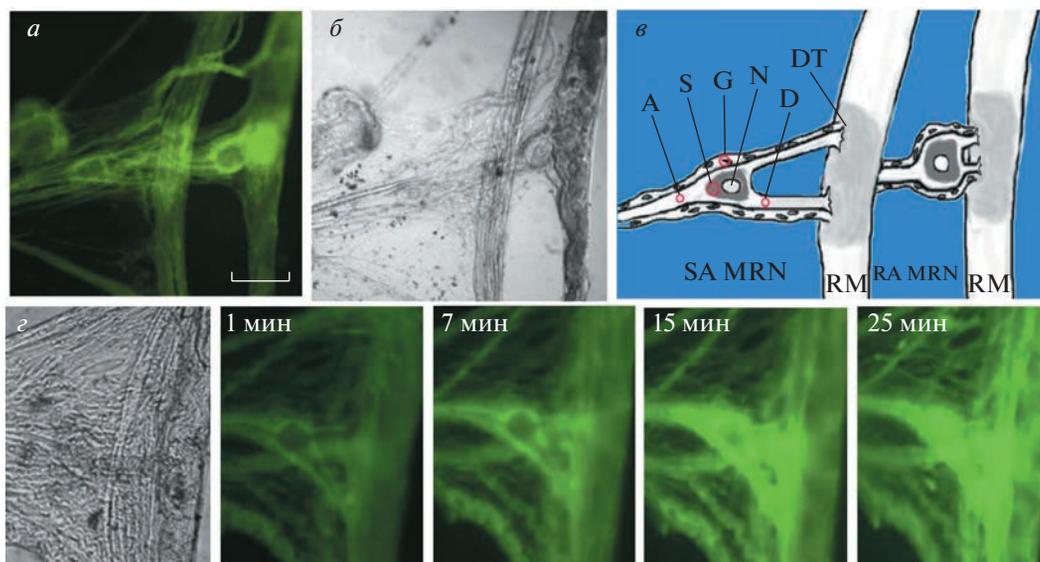


Рис. 4. Генерация NO при фотоокислительном стрессе в механорецепторном нейроне. *а* – Флуоресцентное изображение изолированного рецептора растяжения рака (PPP), окрашенного NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA. *б* – Изолированный PPP в проходящем свете. *в* – Схема PPP: А – аксон; S – сома; G – многослойная глиальная оболочка; N – ядро нейрона; DT – дендритное дерево; D – дендриты; SA MRN – рецепторная мышца. *з* – Динамика генерации NO в PPP при фотоокислительном стрессе в разные промежутки времени с окраской DAF-2DA. Масштабный отрезок: 100 (*а*) и 50 мкм (*з*).

ваний [109]. Кроме этого, нарушение протеосомной системы приводит к накоплению неправильно уложенных белков, что приводит к вышеуказанным патологическим состояниям [110]. На сегодняшний день известно, что NO и H₂S могут участвовать в фолдинге белков. Однако этот процесс пока плохо изучен.

S-Нитрозилирование белков может приводить к аномальной их укладке [7]. Изначально процесс S-нитрозилирования был описан относительно регуляции активности рецепторов. Впоследствии оказалось, что количество молекулярных мишеней этого процесса гораздо больше. В исследовании было также показано, что неправильный фолдинг белков может быть вызван S-нитрозилированием с дальнейшим окислением цистеиновых аминокислотных остатков в полипептидной цепи [8]. Известно, что убиквитин-лигаза E3 Parkin, служащая для убиквитинирования белков для их последующей протеосомной деградации, играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. S-нитрозилирование Parkin снижает его ферментативную активность, что способствует накоплению неправильно свернутых белков и гибели нейронов [111]. NO может регулировать активность белковой дисульфид-изомеразы (PDI), шаперонового фермента эндоплазматического ретикула (ЭР), который катализирует образование и разрыв дисульфидных связей между остатками цистеина в белках в процессе их фолдинга. S-нитрозилирование PDI ингибирует его каталитическую актив-

ность. В результате происходит накопление аномальных белков на фоне усиления стресса ЭР (рис. 5*а*) [112, 113].

H₂S может связываться с белками Тау, основного компонента нейрофибрилярных клубочков (NFT), и повышать его активность [9]. Гиперфосфорилирование Тау приводит к возникновению NFT и лежит в основе развития ряда нейродегенеративных заболеваний. Однако H₂S может предотвращать этот процесс за счет сульфидирования GSK3β [9]. H₂S ингибирует стресс ЭР (ERS) и последующую, так называемую реакцию развернутых белков (UPR) через ингибирование ПОЛ, окислительного стресса, повышение уровня SIRT1, активацию сигнального пути BDNF/TrkB [114]. Кроме этого, сульфидирование Parkin заметно повышает его каталитическую активность и снижает нейротоксичность при болезни Паркинсона (рис. 5*а*) [115].

Таким образом, NO может нарушать фолдинг белков путем S-нитрозилирования NMDA-рецептора [8], Parkin [111] и PDI [112, 113]. Однако H₂S, наоборот, способен предотвращать накопление неправильно свернутых белков, регулируя активность Тау [9], Parkin [115], SIRT1, BDNF/TrkB и ингибируя ERS, ПОЛ, окислительный стресс [114].

Митохондриальная дисфункция

Митохондриальная дисфункция лежит в основе патофизиологии многих нейродегенеративных

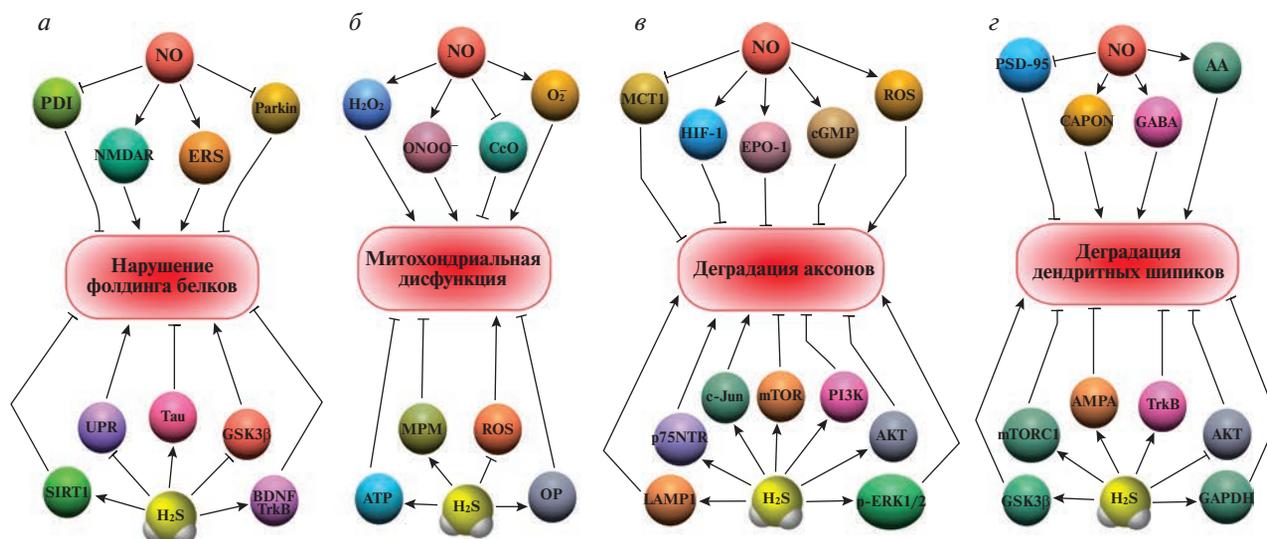


Рис. 5. Схема NO- и H₂S-зависимых сигнальных путей, контролирующих нарушение фолдинга белков (а), митохондриальную дисфункцию (б), деградацию аксона (в) и дендритных шипиков (г). Линии с острым концом – положительная регуляция, с тупым концом – отрицательная.

процессов. Усиление процессов окислительного стресса может приводить к рассогласованию работы митохондриальных комплексов цепи переноса электронов, нарушать митохондриальный Ca²⁺-гомеостаз, способствовать накоплению соматических мутаций в митохондриальных ДНК (мтДНК) и т.д. [116]. NO/ONOO⁻ существенно влияет на митохондриальную дисфункцию в нейронах, приводит к высвобождению глутамата с последующим связыванием с NMDA-рецепторами и активацией nNOS, что влечет за собой стойкое повреждение дыхательной цепи и клеточную гибель [10]. NO или его свободнорадикальные продукты могут стимулировать в митохондриях продукцию O₂⁻, перекиси водорода (H₂O₂), ONOO⁻, а также обратимо и необратимо ингибировать цитохром с-оксидазу (CcO) и индуцировать пермобилизацию митохондриальной мембраны и повреждать мтДНК (рис. 5б) [117].

H₂S защищает митохондрии от структурно-функциональной деградации. Было показано, что H₂S предотвращает снижение мембранного потенциала митохондрий (MPM) [118]. Данный газотрансмиттер может служить энергетическим субстратом для поддержания синтеза ATP в условиях стресс-реакций. CSE может транслоцироваться из цитоплазмы в митохондрии при гипоксии, повышая энергетическую емкость митохондрий за счет усиления окислительного фосфорилирования (OP). Конечно, несомненна роль H₂S в ингибировании митохондриальной дисфункции путем снижения окислительного стресса и захвата активных форм кислорода (АФК) (рис. 5б) [119].

Таким образом, NO может приводить к митохондриальной дисфункции в нейронах через активацию NMDA-рецептора/nNOS/NO/ONOO⁻ [10], усиление продукции O₂⁻, H₂O₂, ингибирование CcO и повреждение мтДНК [117]. Обратный эффект оказывает H₂S, уменьшая уровень окислительного стресса и повышая энергетическую емкость митохондрий [119].

Аксональная дегенерация

Дегенерация аксона происходит при многих нейродегенеративных состояниях. Однако молекулярно-генетические механизмы этого процесса до сих пор остаются плохо изученными. При этом морфологическая и молекулярно-биохимическая картина деградации аксонов при нейродегенеративных заболеваниях во многом схожа с такими патологическими состояниями, как инсульт, нейротравмы центрального и периферического генеза, рассеянного склероза, глаукомы и т.д. Валлеровская дегенерация, характеризующаяся разрушением дистального участка аксона при разрыве, т.е. аксотомии, является наиболее хорошо изученным и классическим процессом дегенерации аксонов [120]. При этом, если не происходит восстановления нервной связи поврежденного аксона со своей мишенью, то нейрон структурно-функционально деградирует и погибает [3]. Известно, что NO и H₂S участвует в процессах, связанных с дегенерацией аксона, при различных патологических состояниях.

NO может препятствовать процессу ремоделирования аксона, усиливая его дегенерацию. На модели аксотомии ганглиозных клеток сетчатки

было показано, что NO усиливает ретроградную дегенерацию аксонов, приводя к гибели нейронов [121]. При рассеянном склерозе NO подавляет монокарбоксилатный переносчик-1 (MCT1) в олигодендроцитах, усиливая процессы деструкции аксонов (рис. 5е) [122]. NO может вызывать блокаду проводимости в аксонах, усиливая валлеровскую дегенерацию [123]. Сообщается, что NOS играют центральную роль в демиелинизации в ЦНС. Часто они осуществляют положительную регуляцию этого процесса [124]. Повышение уровня iNOS наблюдалось в шванновских клетках при боковом амиотрофическом склерозе [11].

Однако есть данные свидетельствующие, что NO может ингибировать аксональную деградацию. Мыши nNOS^{-/-} более уязвимы к периферическим нейропатиям относительно контрольной группы животных. Введение доноров NO могут предотвращать деградацию аксонов нейронов задних корешков спинного мозга. Предполагается, что NO-зависимая защита аксонов реализуется через активацию фактора гипоксии-1 (HIF1) и последующей транскрипции эритропоэтина (EPO) в шванновских клетках [125]. Передача сигналов через NO/sGC/cGMP является важным механизмом в регенерации аксонов (рис. 5е) [126].

H₂S может приводить к деструкции миелиновой оболочки и привлечению макрофагов, позитивно влияя на дедифференцировку и пролиферацию шванновских клеток при валлеровской деградации путем регулирования LAMP1, p75NTR, c-Jun and p-ERK1/2 [12]. Однако другими авторами было показано, что H₂S может способствовать ремиелинизации и регенерации аксонов через активацию сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR при черепно-мозговой травме (рис. 5е) [127].

Таким образом, NO может усиливать дегенерацию аксонов [122–124] либо препятствовать этому процессу через активацию HIF1 и EPO [125] и NO/sGC/cGMP [126]. Роль H₂S также неоднозначна в деструкции миелиновой оболочки [12, 127].

Дегенерация дендритных шипиков

Дендритные шипики являются небольшими выступами на дендритной мембране, где формируется контакт с соседними аксонами для получения синаптического сигнала. Они очень пластичны, их размер и форма меняется в зависимости от активности нейронов. Характерным признаком является постсинаптическая плотность, характеризующаяся расположением каналов, рецепторов киназ/фосфатаз, удерживаемых соответствующими каркасными белками. Нейродегенеративные процессы характеризуются потерей синапсов и элиминацией дендритных шипиков [128].

Было обнаружено, что дендритные шипики содержат nNOS и eNOS [13]. Взаимодействие nNOS с белком постсинаптической плотности-95 (PSD95) негативно влияет на регенерацию нейронов и образование дендритных шипиков [129]. Усиление связывания nNOS со своим адаптерным белком CAPON, карбоксиконцевой лиганд PDZ, увеличивалось в моделях Альцгеймера и приводило к элиминации дендритных шипиков [130]. В исследовании улучшение нейропластичности при ишемии головного мозга было достигнуто путем диссоциации nNOS–PSD95, вызванной инъекцией рекомбинантного белка Tat-nNOS-N_{1–133}. Наблюдалось увеличение синаптогенеза и плотности дендритных шипиков в результате ингибирования активации астроцитов (AA) и продукции ГАМК (GABA) (рис. 5з) [14].

H₂S может защищать дендритные шипики от деградации путем активации сигнального каскада mTORC1/TrkB/AMPA [15]. При этом сообщается, что H₂S при нейровоспалении сульфидирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) в дендритах, приводя к ее связыванию с лигазой E3 Siah, которая, в свою очередь, взаимодействует с PSD95, вызывая его деградацию через убиквитинирование [131]. Кроме этого, избыточная продукция H₂S может сульфидировать АКТ, нарушая его связывание и фосфорилирование GSK3β. В результате происходит гиперфосфорилирование GSK3β белка Tau, который начинает накапливаться в дендритных шипиках, вызывая синаптическую дисфункцию (рис. 5з) [132].

Таким образом, взаимодействие nNOS с PSD95 и CAPON может приводить к деградации дендритных шипиков [14, 129, 130]. В свою очередь, H₂S препятствует этому процессу через активацию mTORC1/TrkB/AMPA [15] либо способствует через сульфидирование GAPDH [131] и АКТ [132].

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОТРАВМАХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Апоптоз

Апоптоз – основная форма программируемой клеточной гибели, для которой характерен распад клетки на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной, в результате активации сложного молекулярно-биохимического каскада. Апоптоз является неотъемлемым звеном нормального развития и функционирования организма. Однако избыточность этого процесса становится негативным фактором в патогенезе многих заболеваний [133]. На сего-

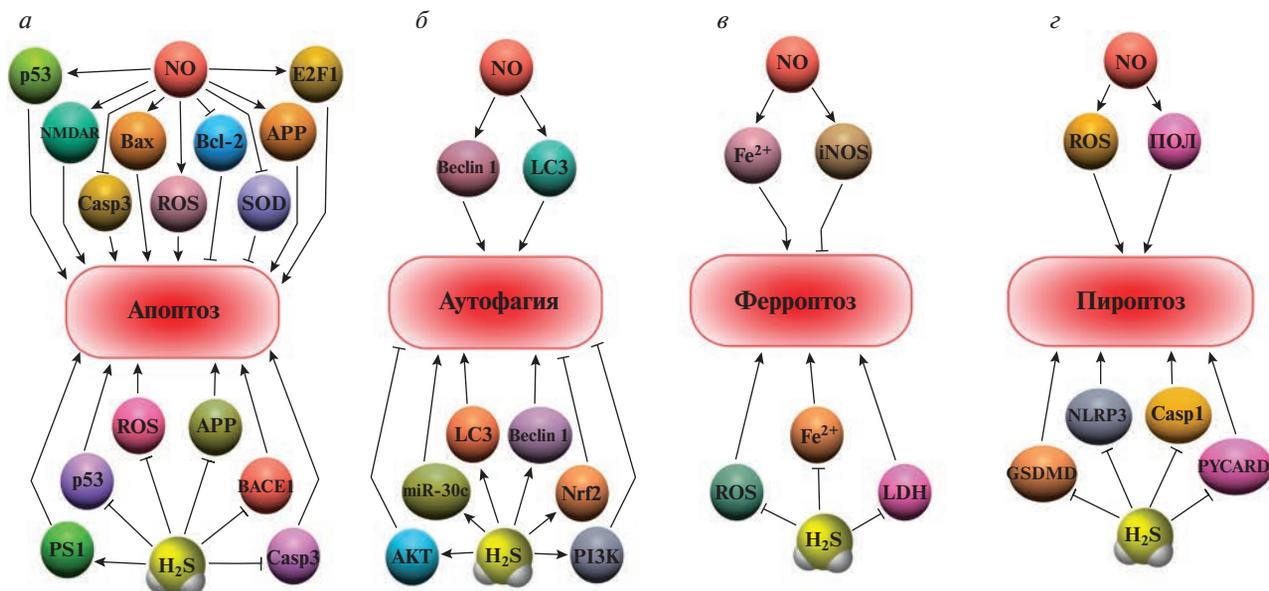


Рис. 6. Схема NO- и H₂S-зависимых сигнальных путей, контролирующих апоптоз (а), аутофагию (б), ферроптоз (в) и пироптоз (г). Линии с острым концом – положительная регуляция, с тупым концом – отрицательная.

дняшний день доказано, что NO и H₂S являются важнейшими регуляторами апоптоза в норме и при различных патологических состояниях.

Известно, в силу своей свободнорадикальной природы NO может нарушать работу антиоксидантной системы и приводить к нитрозильному стрессу [94], который затем ведет к интенсификации ПОЛ, истощению пула АТР, нарушению функции Ca²⁺-каналов, деструкции цитоскелета, митохондриальной дисфункции и т.д., что в конечном итоге может запустить апоптоз [95]. Также гиперпродукция NO может вызывать Ca²⁺-эксайтотоксичность путем активации NMDA-рецепторов (рис. 6а). В результате происходит Ca²⁺-перегрузка клетки, увеличение проницаемости внешней митохондриальной мембраны и выход из митохондрий в цитоплазму цитохрома с и факторов, реализующих апоптоз [16]. Однако существуют и более тонкие NO-зависимые сигнальные механизмы, реализующие данный вид клеточной гибели. Они основываются на модулировании экспрессии и локализации проапоптотических белков путем прямого связывания с ними. Противоположную роль играет H₂S, который в большей степени смещает “баланс клеточной судьбы” в сторону выживания, реализуя антиапоптотические эффекты [17].

Так, например, в своей недавней работе мы изучили влияние NO и, в частности, продукцию его iNOS, на экспрессию и локализацию белка p53 в нейронах и глиальных клетках ганглиев задних корешков (DRG) спинного мозга крысы при перерезке седалищного нерва (рис. 7) [134]. Из-

вестно, что p53, известный как опухолевый супрессор или “страж генома”, является важнейшим регулятором внутриклеточных процессов, связанных с репарацией ДНК, клеточным циклом, метаболизмом, а также апоптотическим сигналингом. Белок p53 занимает ключевую позицию в патогенезе различных патологических состояний, включая нейродегенеративные болезни и нейротравмы [5].

Нам удалось показать, что аксотомия приводит к выходу p53 из ядра в цитоплазму, где он, вероятно, связывается с митохондриями и запускает апоптоз не транскрипционно-зависимым путем. Использование NO-донора нитропруссид натрия (SNP) приводило к значительному ядерному депонированию p53 в ядрах и менее выраженному в цитоплазме нейронов, а также в карิโอплазме глиальных клеток через 4 и 24 ч после аксотомии. Применение селективного ингибитора iNOS гемисульфата S-метилизотиомочевин (SMT), наоборот, увеличивало ядерно-цитоплазматическую транслокацию. Нам удалось показать, что уровень iNOS увеличивается не только в цитоплазме, но и в ядре в клетках DRG в условиях аксонального стресса (рис. 7). Кроме этого, SNP увеличивал апоптоз нейронов и глиальных клеток через 24 ч и 7 сут после травмы, а SMT оказывал нейропротекторный эффект (рис. 8). Причем использование SNP приводило к повышению проапоптотического белка Bax и особо не влияло на экспрессию антиапоптотического белка Bcl2 в клетках DRG, обратный эффект достигался с помощью введения экспериментальным животным SMT [134].

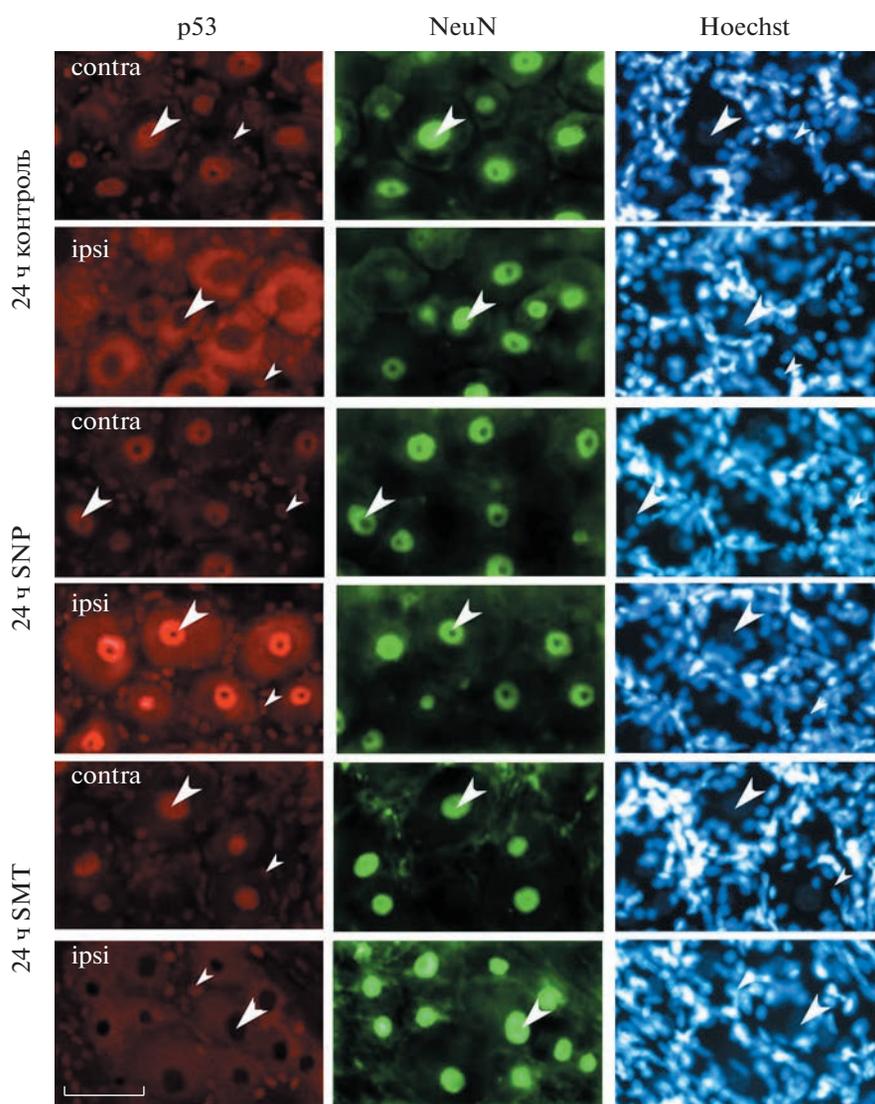


Рис. 7. Иммунофлуоресцентная микроскопия: экспрессия p53 в нейронах DRG крыс контрольной группы и экспериментальных групп животных, которым вводили SNP и SMT через 24 ч после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок – 50 мкм; ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; Hoechst – краситель, который визуализирует ядра всех клеток.

NO может повышать уровень p53 через связывание с сайтами фосфорилирования p53, что приводит к нарушению его взаимодействия с E3-убиквитинлигазой Mdm2, являющейся основным негативным регулятором данного фактора транскрипции [135]. Кроме этого, NO может вызывать значительное ингибирование ядерного экспорта p53 путем регулирования активности серин/треониновой протеинкиназы (ATR), которая фосфорилируя Ser15, расположенный в N-концевом домене p53, приводит к депонированию p53 в нуклеоплазме [136]. В свою очередь, нейропротекторный эффект H_2S может реализовываться через ингибирование уровня p53 в условиях травматического повреждения головного мозга [137].

Данные газотрансмиттеры могут регулировать и E2F1, фактор транскрипции, активирующий экспрессию p53, и также являющийся проапоптотическим фактором. Было показано, что NO индуцирует гиперфосфорилирование и инактивацию pRb (белок ретинобластомы Rb), что приводит к повышенной экспрессии E2F1 (рис. 6a) [138]. NO, активируя p38 MAPK, увеличивает связывание E2F1 с генами-мишенями [139]. На сегодняшний день остается неизвестной роль H_2S в регуляции E2F1.

Другим белком, обладающим проапоптотической активностью, является предшественник бета-амилоида (Amyloid precursor protein, APP) – крупный трансмембранный гликопротеин, кото-

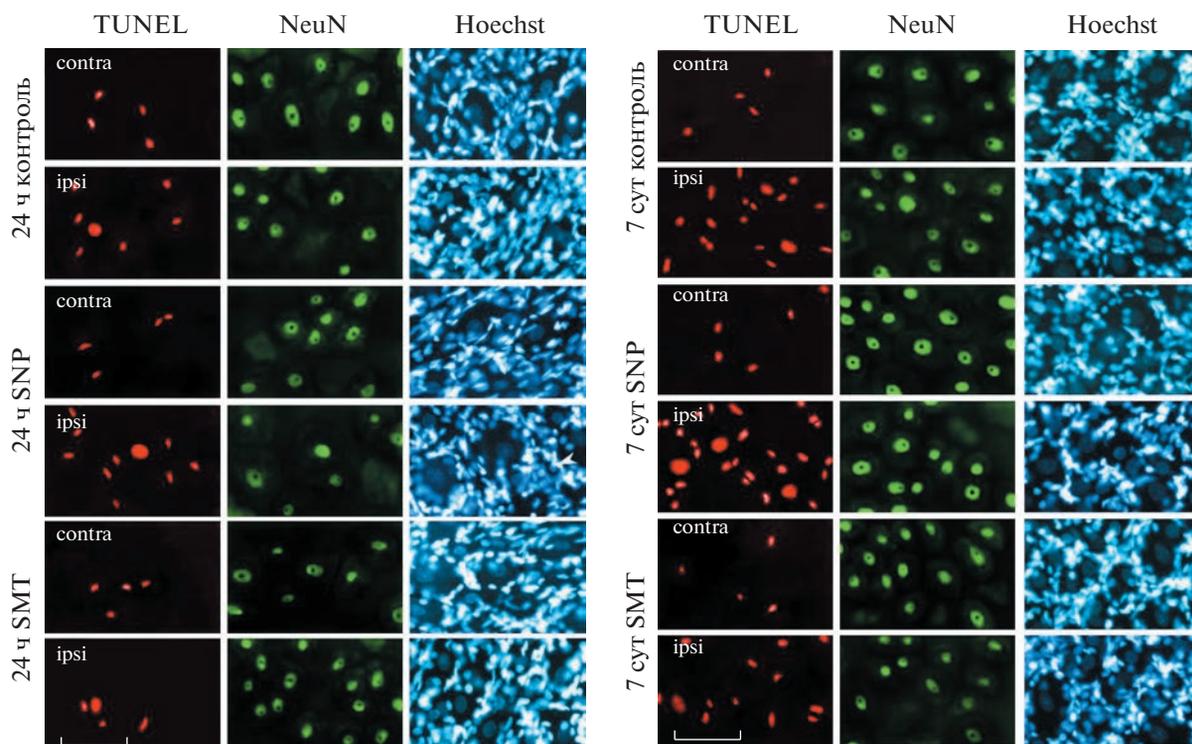


Рис. 8. Флуоресцентная микроскопия апоптотических клеток, окрашенных TUNEL в срезах DRG контрольной группы и экспериментальных групп животных, которым вводили SNP и SMT, через 24 ч и 7 сут после аксотомии. Масштабный отрезок – 50 мкм; ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контролатеральный контрольный ганглий. TUNEL – ядерный маркер апоптоза клеток, NeuN – маркер ядер нейронов; Hoechst – краситель, который визуализирует ядра всех клеток.

рый представлен в различных клетках и участвует во многих процессах, включая апоптоз, в норме и при патологических состояниях. Особенно высокий уровень APP обнаруживается в нейронах. В основном APP интенсивно изучается в контексте патогенеза болезни Альцгеймера. Однако его роль в нервной системе намного более разнообразна, он участвует во многих нейрональных процессах, включая нейротравмы [140]. Биологической активностью обладает как полноразмерный APP, так и продукты его протеолитического распада: sAPP α , sAPP β , A β , AICD [141]. NO может модулировать уровень APP (рис. 6a) через амилоидногенный путь процессинга, активируя его либо ингибируя в зависимости от своей концентрации. NO-зависимый антиамилоидногенный эффект был связан с активацией сигнального пути GC/cGMP/PKG, а амилоидногенная активность повышалась при высоких концентрациях NO [140]. В другом исследовании на примере болезни Паркинсона было показано, что NO может регулировать экспрессию APP путем увеличения связывания IRP1/2 и IRE [142]. H₂S может ингибировать экспрессию APP, подавляя активность BACE1 и γ -секретазы (PS1) [102]. NO может вызывать апоптоз дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона через накопление мутантной формы Cu, Zn-супероксиддисмутазы

(mSOD1), а также снижения нейротрофических факторов (рис. 6a) [118]. Однако H₂S может снижать апоптоз нейронов при данной патологии через ингибирование митохондриальной дисфункции [119].

NO и H₂S могут регулировать каспазы, ключевые белки апоптоза. NO может ингибировать активацию каспазы-3 через cGMP-зависимые сигнальные пути и иные механизмы [143]. NO-зависимое S-глутатионилирование может быть одним из механизмов регуляции активности каспазы-3 [144]. В свою очередь, H₂S может уменьшать уровень каспазы-3 в поврежденных клетках [145]. H₂S может влиять на активность каспазы-3 путем регулирования АФК-сигнального пути активации данного фермента либо персульфидирования по цистеину 163 (рис. 6a) [146].

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что NO больше склонен оказывать проапоптотический эффект, связанный с гиперактивацией NMDA-рецептора, развитием окислительного стресса и повышением уровня белков, индуцирующих апоптоз. В свою очередь, H₂S может нивелировать эти негативные эффекты, снижая уровень свободных радикалов и ингибируя активность апоптотических белков через механизмы персульфидирования.

Аутофагия

Аутофагия — основной механизм внутриклеточной деградации, с помощью которой цитоплазматический материал доставляется в лизосому и подвергается деградации. Она необходима для выживания клеток в реакции на различные стресс-факторы и последующего восстановления клеточного гомеостаза. Однако аутофагия может стать причиной клеточной гибели в патофизиологических условиях [147].

Было показано, что ингибирование синтеза NO приводит к уменьшению экспрессии Beclin1 [148]. Кроме этого, NO может модулировать уровень LC3 при ушибе спинного мозга [18]. Сообщается, что NO играет важную роль в аутофагии при нейродегенеративных заболеваниях (рис. 6б) [149].

H₂S регулирует аутофагию нейронов и глиальных клеток при черепно-мозговой травме [19] и повреждении спинного мозга [150]. H₂S может ингибировать аутофагическую гибель при нейротравмах через сигнальный путь PI3K/Akt/Nrf2, который является центральным механизмом аутофагии, а также через уменьшение окислительного стресса [19]. Данный газотрансмиттер приводит к аутофагии путем увеличения miR-30c, Beclin1 и LC3 (рис. 6б) [19].

Ферроптоз

Ферроптоз является еще одним типом программируемой некротической гибели клетки, который характеризуется Fe²⁺-зависимым ПОЛ, уменьшением размера митохондрий и разрывом их мембран [151].

NO играет важную роль в клеточной гибели по пути ферроптоза. Было показано, что iNOS может блокировать ферроптоз нейронов. Селективное ингибирование данной изоформы NOS привело к уменьшению микроглии M1, нейровоспаления и увеличению ферроптоза нервных клеток в модели субарахноидального кровоизлияния [20]. Сообщается, что NO контролирует белки, ответственные за внутриклеточный уровень Fe²⁺, и чрезмерная продукция NO может приводить к перегрузке Fe²⁺ нейронов и их гибели (рис. 6в) [152].

H₂S может защищать клетки от ферроптоза путем активации антиоксидантной системы и захвата АФК [21]. Очень мало данных о роли H₂S в регуляции ферроптоза в нервной ткани. В исследованиях было показано, что он защищает микроглиальные клетки от ферроптоза путем уменьшения уровня лактатдегидрогеназы (LDH), окислительного стресса и излишнего накопления Fe²⁺ (рис. 6в) [153].

Пироптоз

Пироптоз является видом программируемой некротической клеточной гибели, осуществляющейся в результате активации каспазы-1 и разрыва плазматической мембраны. Главной чертой пироптоза является активное выделение IL-1 β и IL-18 и развитие воспаления. На сегодняшний день доказано, что пироптоз играет важное значение при повреждении нервной системы [154].

NO увеличивает пироптоз нейронов, повышая уровень окислительного стресса и перекисного окисления, дестабилизируя антиоксидантную систему защиты и метаболизм (рис. 6з) [22].

Сообщается, что H₂S уменьшает пироптоз нейронов при травме головного мозга, ингибируя криопирин (NLRP3), белок пироптоза Гасдермин D (GSDMD), каспазу-1 и связанный с апоптозом пятнистый белок, содержащий CARD (PYCARD) [155]. H₂S уменьшал пироптоз клеток сетчатки и нейронов головного мозга при ишемии, ингибируя NLRP3/каспазы-1/GSDMD (рис. 6з) [23].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ NO И H₂S В КАЧЕСТВЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ

Оксид азота

Несомненно, NO обладает большим дуализмом своих биологических эффектов, склоняя чашу весов то в сторону нейропротекции, то цитотоксичности. Во многом это определяется той или иной NOS, а также клеточной специфичностью и патологическим состоянием [54]. Однако NO является перспективной мишенью в лечении нейродегенеративных процессов различного генеза.

В клинических фундаментальных исследованиях наиболее часто применяются следующие NO-доноры: органические нитраты (нитроглицерин, изосорбид-5-мононитрат, никорандил, тетранитрат пентаэритрита), S-нитрозотиолы (S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин и S-нитрозо-глутатион), сиднонимины (молсидомин, SIN-1); NONO-аты (JS-K, SPERMINE-NONOate и PROLI-NONOate) и нитропруссид натрия. Они обладают различной фармакокинетикой и фармакодинамикой, что определяет их биологические эффекты. Многие из них оказывают нейропротекторное действие, например, уменьшают размер инфаркта, гипоксию, апоптоз нейронов и глиальных клеток и т.д. Однако их эффекты могут быть и противоположными, что может быть связано с моделью повреждения нервной системы, применяемыми дозами и многими другими причинами. Эти обстоятельства осложняют их использование в медицине и требуют дальнейших исследований [156].

Сероводород

Сообщается, что гибридные нитратные препараты могут быть использованы в лечении болезни Альцгеймера [157]. Имеются убедительные данные, что в патогенез болезни Паркинсона вовлечен NO. Препараты на основе метилового эфира нитро-*L*-аргинина (*L*-NAME), ингибирующего NOS, могут быть применены в лечении данной патологии [158]. В исследованиях показано, что донор NO DETA/NONOate увеличивает нейрогенез при черепно-мозговой травме [159]. *S*-Нитрозоглутатион (GSNO), модулятор NO, оказывает нейропротекторный эффект. GSNO, являясь естественным метаболитом GSH и NO, очень эффективен против окислительного стресса, а также посредством *S*-нитрозилирования NF- κ B может ингибировать экспрессию iNOS [160].

Активно изучается группа производных 7-нитроиндазола, которые селективно ингибируют nNOS, обладая обезболивающим и противосудорожным эффектом [28]. В качестве ингибиторов iNOS рассматриваются производные модифицированного *L*-аргинина (*N*-иминоэтил-*L*-орнитин и *L*-N6-(-1-иминоэтил)-лизин) и вещества неаминокислотного происхождения: гуанидины, бензоксазолы, 2-аминопиридины и изотиомочевины. Эти соединения проявляют нейропротекторный эффект, так, например, аминоксантидин защищает нейроны от гибели при церебральной ишемии [161].

Сообщается, что метаболиты сфинголипидов, например, сфингозин-1-фосфат (S1P), может модулировать уровень NO через путь АКТ/eNOS и рассматриваться в качестве цитопротекторного препарата [162]. Однако указывается, что гликофинголипиды (GSL) увеличивают экспрессию iNOS после травмы спинного мозга, утяжеляя состояние. Применение PDMP, ингибитора глюкозилцерамидсинтазы и галактозилтрансферазы, приводило к уменьшению уровня iNOS и гибели нейронов [163].

В нашем исследовании хорошо себя зарекомендовал селективный iNOS ингибитор SMT, который проявлял нейропротекторный эффект, снижая экспрессию p53 и апоптоз нейронов и глиальных клеток при аксотомии [134]. Кроме этого, в модели фотоокислительного стресса мы испытали ряд модуляторов, влияющих на продукцию NO: активатор NF- κ B Prostratin, ингибитор NF- κ B Parthenolide, активатор растворимой гуанилатциклазы A350619 и ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ, блокатор Ca^{2+} -каналов *L*-типа Nifedipine, блокатор Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны CdCl_2 , Ca^{2+} -ионофор Ionomycin, SMT, ингибитор Ca^{2+} -АТФ-азы эндоплазматического ретикулума tBuBHQ [106]. Все они могут быть использованы в разработке эффективных нейропротекторных препаратов [106, 134].

Более выраженный нейропротекторный эффект характерен для H_2S . Например, использование АТВ-346, ингибитора циклооксигеназы, высвобождающего H_2S , оказывает защитное действие на нейроны от травматического повреждения, восстанавливая уровни GDNF и NGF [74]. Классический донор H_2S , NaHS, оказывает выраженное нейропротекторное действие и наиболее часто используется в фундаментальных исследованиях [19].

Однако сообщается, что стремительное высвобождение H_2S из его неорганических доноров может усугубить патологическое состояние, так как создается патофизиологическая концентрация H_2S , которая обладает цитотоксическим эффектом. Именно поэтому, сейчас идет активная разработка органических веществ, способных пролонгировано выделять H_2S в течение длительного периода времени. Наиболее хорошо себя зарекомендовавшими такого типа препаратами являются ADT-OH (5-(4-гидроксифенил)-3Н-1,2-дитиоциклопентен-3-тион) и ADT, метилпроизводное ADT-OH. Они способны медленно увеличивать концентрацию H_2S в течение 48 ч и оказывать выраженный нейропротекторный эффект [164].

Интерес представляют и иные доноры H_2S . Так, использование гидрогеля феррожидкости (FFH) с тетрасульфидом железа (Fe_3S_4), высвобождающего H_2S , уменьшало активацию глиальных клеток и уровень провоспалительных цитокинов, а также увеличивало регенерацию аксонов при травме спинного мозга [165]. Использование фиброина шелка (SF), донора H_2S , приводит к уменьшению пироптоза нейронов, индуцированного черепно-мозговой травмой [155]. Сообщается, что NaHS уменьшает клеточную гибель при инфаркте спинного мозга [166].

Конечно, стоит рассмотреть активаторы и ингибиторы ключевых ферментов, ответственных за синтез H_2S , в нейропротекции. Классическими ингибиторами CBS являются аминоксусная кислота и гидроксилламин (NH_2OH), а ингибиторами CSE – PAG (пропаргилглицин) и β -цианаланин (BCA) [167]. Они могут быть использованы при нейродегенеративных процессах, ассоциированных с нейротоксическим уровнем эндогенного H_2S . Однако во многих моделях повреждения нервной системы использование их приводило к неблагоприятным эффектам за счет снижения эндогенного H_2S , поэтому, возможно, акцент в следующих исследованиях необходимо сделать на разработку эффективных активаторов CBS и CSE, которых, к сожалению, не так много. Так, например, наиболее известным аллостерическим активатором CBS является *S*-адено-

зил-*L*-метионин (SAM), оказывающий нейропротекторное действие [168].

Современная нейропротекторная терапия с использованием доноров NO и H₂S и ингибиторов/активаторов ферментов их синтеза пока находится на этапе формирования и понимания сложности газотрансмиттер-зависимых сигнальных механизмов выживания и гибели нейронов и глиальных клеток. Однако, несомненно, ее использование поможет в лечении многих нейропатологических состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, NO и H₂S являются важными молекулярными игроками при нейродегенеративных процессах, участвуя в разнообразных биологических эффектах, таких как нейровоспаление и окислительный стресс, нарушение фолдинга белков, митохондриальная дисфункция, аксональная и дендритная дегенерация. Кроме этого, они регулируют различные типы программируемой клеточной гибели нейронов и глиальных клеток: апоптоз, аутофагию, ферроптоз и пироптоз. Если рассматривать картину в целом, то NO больше склоняет чашу в сторону нейротоксичности из-за своей агрессивной свободнорадикальной природы и высокореакционных продуктов метаболизма, а H₂S проявляет больше нейропротекторные эффекты.

Эти знания станут основой теоретической базы, которая поможет лучше понять фундаментальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при нейропатологиях. NO и H₂S можно рассматривать как многообещающую молекулярную мишень для разработки потенциальных нейропротективных препаратов нового поколения, для создания эффективных терапевтических подходов, направленных на выживаемость нейронов и глиальных клеток при нейродегенеративных процессах.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта “Наука-2030”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V. 2003. Series introduction neurodegeneration what is it and where are we? *J. Clin. Invest.* **111**, 3–10.
- Pérez-Neri I., Ramírez-Bermúdez J., Montes S., Ríos C. 2006. Possible mechanisms of neurodegeneration in schizophrenia. *Neurochem. Res.* **31**, 1279–1294.
- Dzreyan V., Rodkin S., Nikul V., Pitinova M., Uzden-sky A. 2021. The expression of E2F1, p53, and caspase 3 in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection. *J. Mol. Neurosci.* **71**, 826–835.
- Dreßler J., Hanisch U., Kuhlisch E., Geiger K. 2007. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int. J. Legal Med.* **121**, 365–375.
- Ролькин С.В., Дзряян В.А., Демьяненко С.В., Узденский В.Б. 2021. Роль p53-зависимых сигнальных путей в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении периферической нервной системы. *Биол. мембраны.* **38** (6), 402–417.
- Flores G., Morales-Medina J., Diaz A. 2016. Neuronal and brain morphological changes in animal models of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* **301**, 190–203.
- Nakamura T., Lipton S. 2017. ‘SNO’-storms compromise protein activity and mitochondrial metabolism in neurodegenerative disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 879–892.
- Muchowski P., Wacker J. 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 11–22.
- Giovinazzo D., Bursac B., Sbodio J., Nalluru S., Vignane T., Snowman A., Albacarys L., Sedlak T., Torregrossa R., Whiteman M., Filipovic M., Snyder S., Paul D. 2021. Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer’s disease by sulfhydrating GSK3β and inhibiting Tau hyperphosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2017225118.
- Stewart V., Heales S. 2003. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction implications for neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 287–303.
- Chen K., Northington F., Martin L. 2010. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct. Funct.* **214**, 219–234.
- Jung J., Jeong N. 2014. Hydrogen sulfide controls peripheral nerve degeneration and regeneration a novel therapeutic strategy for peripheral demyelinating disorders or nerve degenerative diseases. *Neural. Regen. Res.* **9**, 2119.
- Caviedes A., Varas-Godoy M., Lafourcade C., Sandoval S., Bravo-Alegria J., Kaehne T., Massmann A., Figueroa J., Nualart F., Wyneken U. 2017. Endothelial nitric oxide synthase is present in dendritic spines of neurons in primary cultures. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 180.
- Lin Y., Liang H., Xu K., Ni H., Dong J., Xiao H., Chang L., Wu H., Li F., Zhu D., Luo C. 2018. Dissociation of nNOS from PSD-95 promotes functional recovery after cerebral ischaemia in mice through reducing excessive tonic GABA release from reactive astrocytes. *J. Pathol.* **244**, 176–188.
- Hou X., Hu Z., Zhang D., Lu W., Zhou J., Wu P., Guan X., Han Q., Deng S., Zhang H., Chen J., Wang F. 2017. Rapid antidepressant effect of hydrogen sulfide evidence for activation of mTORC1-TrkB-

- AMPA receptor pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 472–488.
16. Wang Y., Hong F., Yang S. 2022. Roles of nitric oxide in brain ischemia and reperfusion. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4243.
 17. Ghanbari F., Khaksari M., Vaezi G., Hojati V., Shiravi A. 2019. Hydrogen sulfide protects hippocampal neurons against methamphetamine neurotoxicity via inhibition of apoptosis and neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* **67**, 133–141.
 18. Park K., Lee Y., Park S., Lee S., Hong Y., Kil S., Hong Y. 2010. Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. *J. Pineal Res.* **48**, 270–281.
 19. Zhang J., Zhang S., Shan H., Zhang M. 2020. Biologic effect of hydrogen sulfide and its role in traumatic brain injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 7301615.
 20. Qu W., Cheng Y., Peng W., Wu Y., Rui T., Luo C., Zhang J. 2022. Targeting iNOS alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage via promoting ferroptosis of M1 microglia and reducing neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.* **59**, 3124–3139.
 21. Jin R., Yang R., Cui C., Zhang H., Cai J., Geng B., Chen Z. 2022. Ferroptosis due to cystathionine γ lyase/hydrogen sulfide downregulation under high hydrostatic pressure exacerbates VSMC dysfunction. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 829316.
 22. Xu X., Shi R., Fu Y., Wang J., Tong X., Zhang S., Wang N., Li M., Tong Y., Wang W., He M., Liu B., Chen G., Guo F. 2023. Neuronal nitric oxide synthase/reactive oxygen species pathway is involved in apoptosis and pyroptosis in epilepsy. *Neural Regen. Res.* **18**, 1277.
 23. Yang K., Li W., Liu Y., Wei Y., Ren Y., Mai C., Zhang S., Zuo Y., Sun Z., Li D., Yang C. 2022. Hydrogen sulfide attenuates neuroinflammation by inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in retina or brain neuron following rat ischemia/reperfusion. *Brain Sci.* **12**, 1245.
 24. Chen Y., Chen Y., Chiu H., Ko Y., Wang R., Wang W., Chuang Y., Huang C., Lu T. 2021. Cell-penetrating delivery of nitric oxide by biocompatible dinitrosyl iron complex and its dermato-physiological implications. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10101.
 25. Goshi E., Zhou G., He Q. 2019. Nitric oxide detection methods *in vitro* and *in vivo*. *Med. Gas Res.* **9**, 192–207.
 26. Hall C., Garthwaite J. 2009. What is the real physiological NO concentration *in vivo*? *Nitric Oxide.* **21**, 92–103.
 27. Forstermann U., Sessa W. 2012. Nitric oxide synthases regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837.
 28. Львова О.А., Орлова А.Е., Гусев В.В., Ковтун О.П., Чегодаев Д.А. 2010. К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы. *Системная интеграция в здравоохранении.* **4**, 20–30.
 29. Kone B. 2001. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* **51**, 429–441.
 30. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Носарев А.В., Петрова И.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Реутов В.П. 2015. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих. *Успехи физиол. наук.* **46**, 53–73.
 31. Keszler A., Lindemer B., Hogg N., Weihrauch D., Lohr N. 2018. Wavelength-dependence of vasodilation and NO release from S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes by far red/near infrared light. *Arch. Biochem. Biophys.* **649**, 47–52.
 32. Vincent S. 2010. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* **90**, 246–255.
 33. Yang G., Chen G., Ebner T., Iadecola C. 1999. Nitric oxide is the predominant mediator of cerebellar hyperemia during somatosensory activation in rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **277**, R1760–R1770.
 34. Kodama T., Koyama Y. 2006. Nitric oxide from the laterodorsal tegmental neurons its possible retrograde modulation on norepinephrine release from the axon terminal of the locus coeruleus neurons. *Neuroscience.* **138**, 245–256.
 35. Vincent S. 2000. The ascending reticular activating system – from aminergic neurons to nitric oxide. *J. Chem. Neuroanat.* **18**, 23–30.
 36. Lin D., Fretier P., Jiang C., Vincent S. 2010. Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. *Synapse.* **64**, 460–466.
 37. Яковлева О.В., Шафигуллин М.У., Ситдикова Г.Ф. 2013. Роль оксида азота в регуляции секреции медиатора и процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы. *Нейрохимия.* **30**, 109–116.
 38. Garthwaite J. 2019. NO as a multimodal transmitter in the brain discovery and current status. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 197–211.
 39. Gallo E., Iadecola C. 2011. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP protein kinase g and extracellular signal-regulated kinase. *J. Neurosci.* **31**, 6947–6955.
 40. Bradley S., Steinert J. 2016. Nitric oxide-mediated posttranslational modifications impacts at the synapse. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 5681036.
 41. Selvakumar B., Jenkins M., Hussain N., Haganir R., Traynelis S., Snyder S. 2013. S-nitrosylation of AMPA receptor GluA1 regulates phosphorylation single-channel conductance and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1077–1082.
 42. Schafe G., Bauer E., Rosis S., Farb C., Rodrigues S., LeDoux J. 2005. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 201–211.
 43. Судоргина П.В., Саульская Н.Б. 2015. Звуковые сигналы опасности активируют нитриргическую систему медиальной префронтальной коры. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **101**, 778–788.
 44. Балабан П.М., Рошин М.В., Коршунова Т.А. 2011. Двухликий оксид азота необходим и для стирания памяти и для формирования памяти. *Журн. высш. нервн. деятельности им. И.П. Павлова.* **61**, 274–280.
 45. Ill-Raga G., Tajés M., Busquets-García A., Ramos-Fernández E., Vargas L., Bosch-Morató M., Guiverneau B., Valls-Comamala V., Eraso-Pichot A., Guix F.,

- Fandos C., Rosen M., Rabinowitz M., Maldonado R., Alvarez A., Ozaita A., Muñoz F. 2015. Physiological control of nitric oxide in neuronal BACE1 translation by heme-regulated eIF2 α kinase HRI induces synaptogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1295–1307.
46. Ill-Raga G., Köhler C., Radiske A., Lima R., Rosen M., Muñoz F., Cammarota M. 2013. Consolidation of object recognition memory requires HRI kinase-dependent phosphorylation of eIF2 α in the hippocampus. *Hippocampus.* **23**, 431–436.
47. Bel E., Del Guimarães F., Bermúdez-Echeverry M., Gomes M., Schiaveto-de-Souza A., Padovan-Neto F., Tumas V., Barion-Cavalcanti A., Lazzarini M., Nucci-da-Silva L., de Paula-Souza D. 2005. Role of nitric oxide on motor behavior. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 371–392.
48. Contestabile A. 2012. Role of nitric oxide in cerebellar development and function focus on granule neurons. *Cerebellum.* **11**, 50–61.
49. Xiao Q., Ying J., Xiang L., Zhang C. 2018. The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine (Baltimore).* **97**, e13065.
50. Kolesnikov S., Vlasov B., Kolesnikova L. 2015. Hydrogen as a third essential gas molecule in living tissues. *Ann. Russ. Acad. Med. Sci.* **70**, 237–241.
51. Lu D., Wang L., Liu G., Wang S., Wang Y., Wu Y., Wang J., Sun X. 2022. Role of hydrogen sulfide in subarachnoid hemorrhage. *CNS Neurosci. Ther.* **28**, 805–817.
52. Kimura H., Shibuya N., Kimura Y. 2012. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 45–57.
53. Furne J., Saeed A., Levitt M.D. 2008. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1479–R1485.
54. Rodkin S., Nwosu C., Sannikov A., Tyurin A., Chulkov V., Raevskaya M., Ermakov A., Kirichenko E., Gasanov M. 2023. The role of gasotransmitter-dependent signaling mechanisms in apoptotic cell death in cardiovascular rheumatic kidney and neurodegenerative diseases and mental disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6014.
55. Sen N. 2017. Functional and molecular insights of hydrogen sulfide signaling and protein sulfhydration. *J. Mol. Biol.* **429**, 543–561.
56. Zhu H., Blake S., Chan K., Pearson R., Kang J. 2018. Cystathionine β -synthase in physiology and cancer. *Biomed Res. Int.* **11**, 3205125.
57. Zuhra K., Augsburg F., Majtan T., Szabo C. 2020. Cystathionine- β -synthase molecular regulation and pharmacological inhibition. *Biomolecules.* **10**, 697.
58. Jurkowska H., Kaczor-Kamińska M., Bronowicka-Adamska P., Wróbel M. 2014. Cystathionine γ -lyase. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **68**, 1–9.
59. Sharif A., Iqbal M., Manhoosh B., Gholampoor N., Ma D., Marwah M., Sanchez-Aranguren L. 2023. Hydrogen sulphide-based therapeutics for neurological conditions perspectives and challenges. *Neurochem. Res.* **48**, 1981–1996.
60. Lupoli R., Di Minno A., Spadarella G., Franchini M., Sorrentino R., Cirino G., Di Minno G. 2015. Methylation reactions the redox balance and atherothrombosis the search for a link with hydrogen sulfide. *Semin. Thromb. Hemost.* **41**, 423–432.
61. Yakovlev A., Kurmasheva E., Ishchenko Y., Giniatullin R., Sitdikova G. 2017. Age-dependent subunit specific action of hydrogen sulfide on GluN1/2A and GluN1/2B NMDA receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 375.
62. Munaron L., Avanzato D., Moccia F., Mancardi D. 2013. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium.* **53**, 77–84.
63. Liu D., Wang Z., Zhan J., Zhang Q., Wang J., Zhang Q., Xian X., Luan Q., Hao A. 2014. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease in hippocampal neurogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **116**, 55–63.
64. Kamat P., Kalani A. 2015. Abstract T P87 hydrogen sulfide enhances neurogenesis through the IRAK-1/GSK3 β /AKT signaling pathways after ischemic stroke. *Stroke.* **46**, ATP87–ATP87.
65. Pomierny B., Krzyżanowska W., Jureczyk J., Skórkowska A., Strach B., Szafarz M., Przejczowska-Pomierny K., Torregrossa R., Whiteman M., Marcinkowska M., Pera J., Budziszewska B. 2021. The slow-releasing and mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) Delivery molecule AP39 induces brain tolerance to ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7816.
66. Mohseni F., Bagheri F., Razaiee R., Norozi P., Khaksari M. 2020. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment via increases of BDNF expression and hippocampal neurogenesis following early postnatal alcohol exposure. *Physiol. Behav.* **215**, 112784.
67. Вараксин А.А., Пушина Е.В. 2012. Значение сероводорода в регуляции функций органов. *Тихоокеанский мед. журн.* **2**, 27–36.
68. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф. 2014. Физиологическая роль сероводорода в нервной системе. *Гены и клетки.* **9**, 34–40.
69. Wang M., Zhu J., Pan Y., Dong J., Zhang L., Zhang X., Zhang L. 2015. Hydrogen sulfide functions as a neuromodulator to regulate striatal neurotransmission in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* **93**, 487–494.
70. Ali R., Pal H., Hameed R., Nazir A., Verma S. 2019. Controlled release of hydrogen sulfide significantly reduces ROS stress and increases dopamine levels in transgenic *C. elegans*. *Chem. Commun.* **55**, 10142–10145.
71. Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В., Одношвикина Ю.Г., Зефилов А.Л. 2011. Влияние сероводорода на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. *Нейрохимия.* **28**, 280–286.
72. Gerasimova E., Lebedeva J., Yakovlev A., Zefirov A., Giniatullin R., Sitdikova G. 2015. Mechanisms of hydrogen sulfide (H₂S) action on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience.* **303**, 577–585.

73. Wang Y., Jia J., Ao G., Hu L., Liu H., Xiao Y., Du H., Alkayed N., Liu C., Cheng J. 2014. Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **129**, 827–838.
74. Campolo M., Esposito E., Ahmad A., Di Paola R., Paterniti I., Cordaro M., Bruschetta G., Wallace J., Cuzzocrea S. 2014. Hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation.* **11**, 196.
75. Tabassum R., Jeong N. 2019. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases. *Int. J. Med. Sci.* **16**, 1386–1396.
76. Zhang M., Shan H., Wang T., Liu W., Wang Y., Wang L., Zhang L., Chang P., Dong W., Chen X., Tao L. 2013. Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice. *Neurochem. Res.* **38**, 714–725.
77. Ide M., Ohnishi T., Toyoshima M., Balan S., Maekawa M., Shimamoto-Mitsuyama C., Iwayama Y., Ohba H., Watanabe A., Ishii T., Shibuya N., Kimura Y., Hisano Y., Murata Y., Hara T., Morikawa M., Hashimoto K., Nozaki Y., Toyota T., Wada Y., Yoshikawa T. 2019. Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology. *EMBO Mol. Med.* **11**, e10695.
78. Gopalakrishnan P., Shrestha B., Kaskas A., Green J., Alexander J., Pattillo C. 2019. Hydrogen sulfide therapeutic or injurious in ischemic stroke? *Pathophysiology.* **26**, 1–10.
79. DiSabato D., Quan N., Godbout J. 2016. Neuroinflammation the devil is in the details. *J. Neurochem.* **139**, 136–153.
80. Woodburn S., Bollinger J., Wohleb E. 2021. The semantics of microglia activation neuroinflammation homeostasis and stress. *J. Neuroinflammation.* **18**, 258.
81. Liao R., Wood T., Nance E. 2020. Nanotherapeutic modulation of excitotoxicity and oxidative stress in acute brain injury. *Nanobiomedicine.* **7**, 184954352097081.
82. Hirsch E., Vyas S., Hunot S. 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**, S210–S212.
83. Kummer M., Hermes M., Delekarte A., Hamerschmidt T., Kumar S., Terwel D., Walter J., Pape H., König S., Roeber S., Jessen F., Klockgether T., Korte M., Heneka M. 2011. Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron.* **71**, 833–844.
84. Evonuk K., Doyle R., Moseley C., Thornell I., Adler K., Bingaman A., Bevenssee M., Weaver C., Min B., DeSilva T. 2020. Reduction of AMPA receptor activity on mature oligodendrocytes attenuates loss of myelinated axons in autoimmune neuroinflammation. *Sci. Adv.* **6**, eaax5936.
85. Alawieh A., Langley E., Weber S., Adkins D., Tomlinson S. 2018. Identifying the role of complement in triggering neuroinflammation after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* **38**, 2519–2532.
86. Picca A., Calvani R., Coelho-Junior H., Landi F., Bernabei R., Marzetti E. 2020. Mitochondrial dysfunction oxidative stress and neuroinflammation intertwined roads to neurodegeneration. *Antioxidants.* **9**, 647.
87. Gao F., Lucke-Wold B., Li X., Logsdon A., Xu L., Xu S., LaPenna K., Wang H., Talukder M., Siedlecki C., Huber J., Rosen C., He P. 2018. Reduction of endothelial nitric oxide increases the adhesiveness of constitutive endothelial membrane ICAM-1 through src-mediated phosphorylation. *Front. Physiol.* **8**, 1124.
88. Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun C., Buerk D., Huang P., Jain R. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 2604–2609.
89. Hollenberg S., Guglielmi M., Parrillo J. 2007. Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Crit. Care.* **11**, R125.
90. Chen Z., Mou R., Feng D., Wang Z., Chen G. 2017. The role of nitric oxide in stroke. *Med. Gas Res.* **7**, 194.
91. Oh G., Pae H., Lee B., Kim B., Kim J., Kim H., Jeon S., Jeon W., Chae H., Chung H. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 106–119.
92. Kondo K., Bhushan S., King A., Prabhu S., Hamid T., Koenig S., Murohara T., Predmore B., Gojon G., Gojon G., Wang R., Karusula N., Nicholson C., Calvert J., Lefer D. 2013. H2S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* **127**, 1116–1127.
93. Liy P., Puzi N., Jose S., Vidyadaran S. 2021. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* **246**, 2399–2406.
94. Pandareesh M., Anand T. 2014. Neuroprotective and anti-apoptotic propensity of bacopa monniera extract against sodium nitroprusside induced activation of inos heat shock proteins and apoptotic markers in PC12 cells. *Neurochem. Res.* **39**, 800–814.
95. Radi E., Formichi P., Battisti C., Federico A. 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* **42**, S125–S152.
96. Xie Z., Liu Y., Bian J. 2016. Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 6043038.
97. Corsello T., Komaravelli N., Casola A. 2018. Role of hydrogen sulfide in NRF2- and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance. *Antioxidants.* **7**, 129.
98. Bruce King S. 2013. Potential biological chemistry of hydrogen sulfide (H₂S) with the nitrogen oxides. *Free Radic. Biol. Med.* **55**, 1–7.
99. Austin S., Santhanam A., Hinton D., Choi D., Katusic Z. 2013. Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. *J. Neurochem.* **127**, 691–700.
100. Lundberg J., Weitzberg E. 2022. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell.* **185**, 2853–2878.

101. Tieu K., Ischiropoulos H., Przedborski S. 2003. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life*. **55**, 329–335.
102. He X., Yan N., Chen X., Qi Y., Yan Y., Cai Z. 2016. Hydrogen sulfide down-regulates BACE1 and PS1 via activating PI3K/Akt pathway in the brain of APP/PS1 transgenic mouse. *Pharmacol. Reports*. **68**, 975–982.
103. Tyagi N., Moshal K., Sen U., Vacek T., Kumar M., Hughes W., Kundu S., Tyagi S. 2009. H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal*. **11**, 25–33.
104. Keshherwani V., Nelson K., Agrawal S. 2013. Effect of sodium hydrosulphide after acute compression injury of spinal cord. *Brain Res*. **1527**, 222–229.
105. Logsdon A., Schindler A., Meabon J., Yagi M., Herbert M., Banks W., Raskind M., Marshall D., Keene C., Perl D., Peskind E., Cook D. 2020. Nitric oxide synthase mediates cerebellar dysfunction in mice exposed to repetitive blast-induced mild traumatic brain injury. *Sci. Rep.* **10**, 9420.
106. Rodkin S., Kovaleva V., Berezhnaya E., Neginskaya M., Uzdensky A. 2019. Ca²⁺- and NF- κ B-dependent generation of NO in the photosensitized neurons and satellite glial cells. *J. Photochem. Photobiol. B*. **199**, 111603.
107. Dobson C. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*. **426**, 884–890.
108. Morán Luengo T., Mayer M., Rüdiger S. 2019. The Hsp70–Hsp90 chaperone cascade in protein folding. *Trends Cell Biol*. **29**, 164–177.
109. Naem A., Fazili N. 2011. Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases the darker aspect of proteins. *Cell Biochem. Biophys*. **61**, 237–250.
110. Zheng Q., Huang T., Zhang L., Zhou Y., Luo H., Xu H., Wang X. 2016. Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci*. **8**, 303.
111. Meng F., Yao D., Shi Y., Kabakoff J., Wu W., Reicher J., Ma Y., Moosmann B., Masliah E., Lipton S., Gu Z. 2011. Oxidation of the cysteine-rich regions of parkin perturbs its E3 ligase activity and contributes to protein aggregation. *Mol. Neurodegener*. **6**, 34.
112. Chen X., Guan T., Li C., Shang H., Cui L., Li X., Kong J. 2012. SOD1 aggregation in astrocytes following ischemia/reperfusion injury a role of NO-mediated S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI). *J. Neuroinflammation*. **9**, 237.
113. Xu B., Jin C., Deng Y., Liu W., Yang T., Feng S., Xu Z. 2014. Alpha-synuclein oligomerization in manganese-induced nerve cell injury in brain slices a role of NO-mediated s-nitrosylation of protein disulfide isomerase. *Mol. Neurobiol*. **50**, 1098–1110.
114. Wang H., Shi X., Qiu M., Lv S., Liu H. 2020. Hydrogen Sulfide plays an important protective role through influencing endoplasmic reticulum stress in diseases. *Int. J. Biol. Sci*. **16**, 264–271.
115. Vandiver M., Paul B., Xu R., Karuppagounder S., Rao F., Snowman A., Seok Ko H., Il Lee Y., Dawson V., Dawson T., Sen N., Snyder S. 2013. Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin. *Nat. Commun*. **4**, 1626.
116. Tapias V. 2019. Editorial mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Front. Neurosci*. **13**, 1372.
117. Rachek L., Grishko V., LeDoux S., Wilson G. 2006. Role of nitric oxide-induced mtDNA damage in mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med*. **40**, 754–762.
118. Luo Y., Yang X., Zhao S., Wei C., Yin Y., Liu T., Jiang S., Xie J., Wan X., Mao M., Wu J. 2013. Hydrogen sulfide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase-3 pathway in cortical neurons. *Neurochem. Int*. **63**, 826–831.
119. Guo W., Kan J., Cheng Z., Chen J., Shen Y., Xu J., Wu D., Zhu Y. 2012. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **9**, 878052.
120. Wang J., Medress Z., Barres B. 2012. Axon degeneration molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol*. **196**, 7–18.
121. Koeberle P., Ball A. 1999. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp. Neurol*. **158**, 366–381.
122. Tang X., Lan M., Zhang M., Yao Z. 2017. Effect of nitric oxide to axonal degeneration in multiple sclerosis via downregulating monocarboxylate transporter 1 in oligodendrocytes. *Nitric Oxide*. **67**, 75–80.
123. Smith K., Kapoor R., Hall S. 2001. Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Ann. Neurol*. **49**, 470–476.
124. Liñares D., Taconis M., Maña P., Correcha M., Fordham S., Staykova M., Willenborg D. 2006. neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *J. Neurosci*. **26**, 12672–12681.
125. Keswani S., Bosch-Marcé M., Reed N., Fischer A., Semenza G., Höke A. 2011. Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 4986–4990.
126. Cooke R., Mistry R., Challiss R., Straub V. 2013. Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy. *J. Neurosci*. **33**, 5626–5637.
127. Xu K., Wu F., Xu K., Li Z., Wei X., Lu Q., Jiang T., Wu F., Xu X., Xiao J., Chen D., Zhang H. 2018. NaHS restores mitochondrial function and inhibits autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway to improve functional recovery after traumatic brain injury. *Chem. Biol. Interact*. **286**, 96–105.
128. Pchitskaya E., Bezprozvanny I. 2020. Dendritic spines shape analysis-classification or clusterization? Perspective. *Front. Synaptic Neurosci*. **12**, 31.
129. Luo C., Lin Y., Qian X., Tang Y., Zhou H., Jin X., Ni H., Zhang F., Qin C., Li F., Zhang Y., Wu H., Chang L., Zhu D. 2014. Interaction of nNOS with PSD-95 negatively controls regenerative repair after stroke. *J. Neurosci*. **34**, 13535–13548.
130. Zhang Y., Zhu Z., Liang H., Zhang L., Zhou Q., Ni H., Luo C., Zhu D. 2018. nNOS-CAPON interaction mediates amyloid- β -induced neurotoxicity especially in the early stages. *Aging Cell*. **17**, e12754.

131. Mir S., Sen T., Sen N. 2014. Cytokine-induced GAPDH sulfhydration affects PSD95 degradation and memory. *Mol. Cell.* **56**, 786–795.
132. Sen T., Saha P., Jiang T., Sen N. 2020. Sulfhydration of AKT triggers Tau-phosphorylation by activating glycogen synthase kinase 3 β in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 4418–4427.
133. Wang X., Du J., Cui H. 2014. Sulfur dioxide a double-faced molecule in mammals. *Life Sci.* **98**, 63–67.
134. Rodkin S., Dzreyan V., Bibov M., Ermakov A., Derezhina T., Kirichenko E. 2022. NO-dependent mechanisms of p53 expression and cell death in rat's dorsal root ganglia after sciatic-nerve transection. *Biomedicine.* **10**, 1664.
135. Nakaya N., Lowe S., Taya Y., Chenchik A., Enikolopov G. 2000. Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest. *Oncogene.* **19**, 6369–6375.
136. Wang X., Zalcenstein A., Oren M. 2003. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ.* **10**, 468–476.
137. Sun J., Li X., Gu X., Du H., Zhang G., Wu J., Wang F. 2021. Neuroprotective effect of hydrogen sulfide against glutamate-induced oxidative stress is mediated via the p53/glutaminase 2 pathway after traumatic brain injury. *Aging.* **13**, 7180–7189.
138. Luo Q., Wu X., Chang W., Zhao P., Nan Y., Zhu X., Katz J., Su D., Liu Z. 2020. ARID1A prevents squamous cell carcinoma initiation and chemoresistance by antagonizing pRb/E2F1/c-Myc-mediated cancer stemness. *Cell Death Differ.* **27**, 1981–1997.
139. Cui X., Zhang J., Ma P., Myers D., Goldberg I., Sittler K., Barb J., Munson P., del Pilar Cintron A., McCoy J., Wang S., Danner R. 2005. cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle. *BMC Genomics.* **6**, 151.
140. Cai Z., Guo H., Wang C., Wei M., Cheng C., Yang Z., Chen Y., Le W., Li S. 2016. Double-edged roles of nitric oxide signaling on APP processing and amyloid- β production in vitro preliminary evidence from sodium nitroprusside. *Neurotox. Res.* **29**, 21–34.
141. Kobayashi S., Sasaki T., Katayama T., Hasegawa T., Nagano A., Sato K. 2010. Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid- β after acute spinal cord injury in adult rat. *Neurochem. Int.* **56**, 387–393.
142. Ayton S., Lei P., Hare D.J., Duce J.A., George J.L., Adlard P.A., McLean C., Rogers J.T., Cherny R.A., Finkelstein D.I., Bush A.I. 2015 Parkinson's disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of β -amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **35**, 3591–3597.
143. Tejedo J., Bernabé J., Ramírez R., Sobrino F. 1999. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Lett.* **459**, 238–243.
144. Huang Z., Pinto J., Deng H., Richie J. 2008. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2234–2244.
145. Xu C., Zhang M., Zhang G., Yan S., Yan W. 2021. Hydrogen sulfide improves functional recovery in rat traumatic spinal cord injury model by inducing nuclear translocation of NF-E2-related factor 2. *Biol. Pharm. Bull.* **44**, b21-00259.
146. Ye X., Li Y., Lv B., Qiu B., Zhang S., Peng H., Kong W., Tang C., Huang Y., Du J., Jin H. 2022. Endogenous hydrogen sulfide persulfidates caspase-3 at cysteine 163 to inhibit doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **20**, 6153772.
147. Wu J., Lipinski M. 2019. Autophagy in neurotrauma good bad or dysregulated. *Cells.* **8**, 693.
148. Sarkar S., Korolchuk V., Renna M., Imarisio S., Fleming A., Williams A., Garcia-Arencibia M., Rose C., Luo S., Underwood B., Kroemer G., O'Kane C., Rubinsztein D. 2011. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol. Cell.* **43**, 19–32.
149. Cervia D., Perrotta C., Moscheni C., De Palma C. 2013. Nitric oxide and sphingolipids control apoptosis and autophagy with a significant impact on Alzheimer's disease. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **27**, 11–22.
150. Li L., Jiang H., Li Y., Guo Y. 2015. Hydrogen sulfide protects spinal cord and induces autophagy via miR-30c in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Sci.* **22**, 50.
151. Zhou J., Jin Y., Lei Y., Liu T., Wan Z., Meng H., Wang H. 2020. Ferroptosis is regulated by mitochondria in neurodegenerative diseases. *Neurodegener. Dis.* **20**, 20–34.
152. Feng Z., Min L., Chen H., Deng W., Tan M., Liu H., Hou J. 2021. Iron overload in the motor cortex induces neuronal ferroptosis following spinal cord injury. *Redox Biol.* **43**, 101984.
153. Yu Y., Li X., Wu X., Li X., Wei J., Chen X., Sun Z., Zhang Q. 2023. Sodium hydrosulfide inhibits hemin-induced ferroptosis and lipid peroxidation in BV2 cells via the CBS/H2S system. *Cell. Signal.* **104**, 110594.
154. Hu X., Chen H., Xu H., Wu Y., Wu C., Jia C., Li Y., Sheng S., Xu C., Xu H., Ni W., Zhou, K. 2020. Role of pyroptosis in traumatic brain and spinal cord injuries. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 2042–2050.
155. Chen X., Huang X., Liu C., Li S., Yang Z., Zhang F., Chen X., Shan H., Tao L., Zhang M. 2022. Surface-fill H2S-releasing silk fibroin hydrogel for brain repair through the repression of neuronal pyroptosis. *Acta Biomater.* **154**, 259–274.
156. Godínez-Rubí M., Rojas-Mayorquín A., Ortuño-Sahagún D. 2013. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **16**, 297357.
157. Fernandez P., Pozo-Rodrigalvarez A., Serrano J., Martinez-Murillo R. 2010. Nitric oxide target for therapeutic strategies in alzheimers disease. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2837–2850.
158. Singh S., Das T., Ravindran A., Chaturvedi R.K., Shukla Y. Agarwal A.K. Dikshit M. 2005. Involvement of nitric oxide in neurodegeneration a study on the experimental models of Parkinson's disease. *Redox Rep.* **10**, 103–109.
159. Lu D., Mahmood A., Zhang R., Li Y. 2003. Chopp M. Upregulation of neurogenesis and reduction in functional deficits following administration of DETA/

- NONOate a nitric oxide donor after traumatic brain injury in rats. *J. Neurosurg.* **99**, 351–361.
160. Khan M., Im Y., Shunmugavel A., Gilg A., Dhindsa R., Singh A., Singh I. 2009. Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J. Neuroinflammation.* **6**, 32.
161. Pannu R., Singh I. 2006. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem. Int.* **49**, 170–182.
162. Lai Y., Tian Y., You X., Du J., Huang J. 2022. Effects of sphingolipid metabolism disorders on endothelial cells. *Lipids Health Dis.* **21**, 101.
163. Pannu R., Won J., Khan M., Singh A., Singh I. 2004. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon- γ -mediated inducible nitric oxide synthase gene expression implications for neuroinflammatory diseases. *J. Neurosci.* **24**, 5942–5954.
164. Jia J., Xiao Y., Wang W., Qing L., Xu Y., Song H., Zhen X., Ao G., Alkayed N., Cheng J. 2013. Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress. *Neurochem. Int.* **62**, 1072–1078.
165. Wang R., Wu X., Tian Z., Hu T., Cai C., Wu G., Jiang G., Liu B. 2023. Sustained release of hydrogen sulfide from anisotropic ferrofluid hydrogel for the repair of spinal cord injury. *Bioact. Mater.* **23**, 118–128.
166. Liu Y., Pan L., Jiang A., Yin M. 2018. Hydrogen sulfide upregulated lncRNA CasC7 to reduce neuronal cell apoptosis in spinal cord ischemia-reperfusion injury rat. *Biomed. Pharmacother.* **98**, 856–862.
167. Asimakopoulou A., Panopoulos P., Chasapis C., Coletta C., Zhou Z., Cirino G, Giannis A., Szabo C., Spyroulias G., Papapetropoulos A. 2013. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *Br. J. Pharmacol.* **169**, 922–932.
168. Wang F., Zhou H., Zhang X. 2022. SAM a cystathionine beta-synthase activator promotes hydrogen sulfide to promote neural repair resulting from massive cerebral infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Metab. Brain Dis.* **37**, 1641–1654.

Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Neuronal and Glial Cell Death in Neurodegenerative Processes

S. V. Rodkin^{1, *}, C. D. Nwosu¹

¹Department of Bioengineering, Faculty of Bioengineering and Veterinary Medicine, Don State Technical University, Rostov-on-Don, 344000 Russia

*e-mail: rodkin_stas@mail.ru

Neurodegeneration is a complex progressive pathological process leading to the neuronal death, which is induced by various external and internal factors. Neurodegenerative diseases, injuries of the central and peripheral nervous system, mental disorders, and a number of other pathological conditions, accompanied by functional and structural degradation of neurons and their death, is a serious problem in the global healthcare system, as due to these diseases millions of people around the world become disabled or die every year. The situation is complicated by the lack of selective, clinically effective neuroprotective drugs. It has been shown that nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) are actively involved in neurodegeneration and cell death of neurons and glia, but their role is not completely clear. This review considers NO- and H₂S-dependent signaling mechanisms underlying the pathogenesis of neurodegenerative processes. The prospects for further studies of the role of NO and H₂S in the nervous tissue under conditions of pathological conditions associated with neurodegeneration are considered.

Keywords: nitric oxide, hydrogen sulfide, neurodegeneration, neurons, glial cells, oxidative stress, apoptosis, autophagy, axotomy

УДК 576.08

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

© 2023 г. М. А. Тамбовский^а, *, А. М. Аймалетдинов^а, Е. Ю. Закирова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, 420008 Россия

*e-mail: taxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Криоконсервация сперматозоидов является важной частью сохранения половых клеток различных организмов. Однако при заморозке гамет часто возникают различного рода повреждения, которые оказывают значительное влияние при искусственном оплодотворении. После размораживания, как правило, сперматозоиды имеют ультраструктурные, биохимические и функциональные изменения, такие как повреждение клеточной мембраны и хроматина, окислительный стресс. Так как сперматозоиды обладают ограниченной способностью к биосинтетической деятельности, они имеют низкую способность к регенерации. Современные тенденции заключаются в совершенствовании режима криоконсервации спермы с использованием естественных внеклеточных везикул и стволовых клеток. Внеклеточные везикулы и стволовые клетки обладают потенциальным регенеративным эффектом, поскольку содержат различные биологически активные молекулы, влияющие на репарацию сперматозоидов. Настоящий обзор посвящен современным стратегиям улучшения состояния сперматозоидов после криоконсервации. В частности, в этом обзоре описаны результаты исследований использования внеклеточных везикул и стволовых клеток в качестве криопротекторов при заморозке и оттаивании сперматозоидов.

Ключевые слова: криоконсервация, криоповреждение, сперматозоиды, внеклеточные везикулы, стволовые клетки

DOI: 10.31857/S023347523050110, EDN: FDMSUL

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное оплодотворение и криоконсервирование сперматозоидов являются одним из величайших достижений, которые произвели революцию не только в селекционной промышленности, но и в репродуктивной медицине [1]. Благодаря использованию замороженной спермы и искусственного осеменения, семенной материал от лучших племенных быков может быть использован для осеменения коров по всему миру [2]. Замораживание спермы животных считается обязательным условием сохранения генетического материала от особей с высокой племенной ценностью, а также для животных, находящихся под угрозой исчезновения.

При этом качественная криоконсервация спермы повышает эффективность и успешность искусственного осеменения. Несмотря на достаточно длительный период использования криоконсервации в качестве сохранения спермы, процедуры замораживания не всегда эффективны [3]. Извест-

но, что криоконсервация негативно влияет на качественные характеристики спермы, вызывая изменения на структурном и молекулярном уровнях вследствие термических, механических, осмотических и окислительных повреждений (рис. 1), что, в свою очередь, влияет на способность к оплодотворению и последующее раннее эмбриональное развитие [4].

Также остро стоит вопрос о сохранении половых клеток у редких особей/видов животных, которые плохо переносят криоконсервацию. Реабилитация поврежденных сперматозоидов была бы решающим шагом для увеличения количества фертильных сперматозоидов. Методы улучшения результатов искусственного оплодотворения необходимы для воспроизводства диких кошачьих, особенно снежных барсов, которые плохо размножаются даже в своей естественной среде обитания и практически не размножаются в неволе [5].

Одним из определяющих факторов результативности искусственного осеменения является

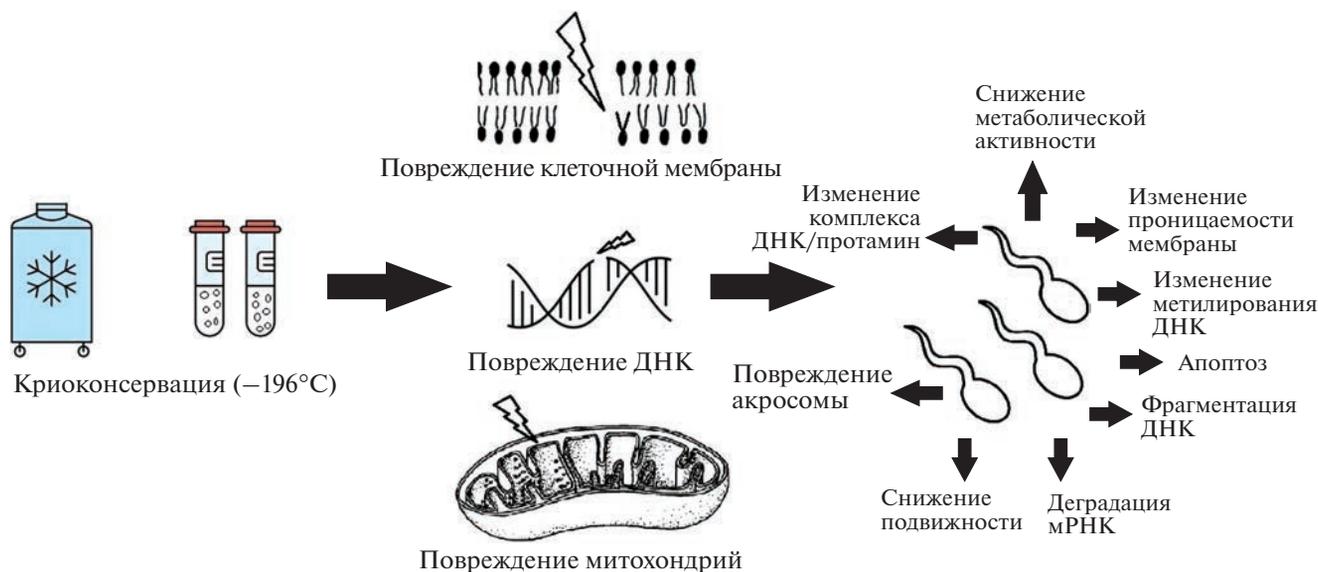


Рис. 1. Возможные повреждения сперматозоидов, возникающие после криоконсервации.

совершенствование методов хранения спермы животных в охлажденном или глубокомзамороженном состоянии. Значительная часть исследовательских работ по криоконсервации спермы сосредоточена на методах/подходах к повышению эффективности замораживания, которые основываются на защите сперматозоидов от повреждающего действия процедуры замораживания, посредством применения различных разбавителей, криопротекторов, антиоксидантов и питательных компонентов [6].

На современном этапе развития криобиологии отдельное внимание уделяется восстановлению поврежденных сперматозоидов во время замораживания и оттаивания. В данном обзоре освещаются стратегии защиты и/или восстановления повреждений сперматозоидов, возникающих во время криоконсервации при использовании клеток животных или их производных совместно с традиционными криопротекторами.

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются неотъемлемой частью регенеративной ветеринарии [7, 8] и медицины [9, 10]. Считается, что восстановление поврежденной ткани происходит за счет мультипотентной природы МСК и связанными с ней паракринными механизмами, включающими секрецию различных сигнальных факторов, главным образом белков [11].

Qatar и соавт. показали, что использование МСК при криоконсервации спермы может быть эффективным биологическим подходом к повы-

шению фертильности и жизнеспособности сперматозоидов, а также путем поддержки механизмов восстановления посредством секреции различных белков МСК [12]. В исследовании изучалось влияние МСК собаки, выделенных из жировой ткани (ЖТ; Adipose-Derived Stem Cells, ADSC) на выживаемость сперматозоидов собак. При этом МСК-ЖТ добавляли перед замораживанием спермы, перемешивали и затем смесь подвергали криоконсервации в криосреде. После оттаивания авторы отмечали улучшение качества сперматозоидов в образцах с ADSC. Вероятно, это произошло за счет воздействия стволовых клеток на механизмы восстановления, оказывающих влияние как на клеточном, так и на молекулярном уровнях на сперматозоиды. Возможной причиной улучшения могли быть белки, секретируемые ADSC, такие как аннексин, дисферлин и фибронектин, которые обычно участвуют в репарации на клеточном уровне [12].

Известно, что аннексины играют важную роль в экзоцитозе, эндоцитозе, агрегации, слиянии мембран, а связывание с Ca^{2+} -зависимой мембраной делает их подходящими для восстановления мембран [13]. Кроме того, аннексин 1 и 2 вместе с белком дисферлином участвуют в Ca^{2+} -зависимой репарации сарколеммы скелетных миоцитов [14].

Фибронектин регулирует клеточные процессы, а также поддержание и восстановление поврежденных тканей. Кроме того, этот белок, находящийся в семенной плазме, оказывает влияние на активацию протеасом, акросомную реакцию, конденсацию, взаимодействие гамет и эмбриональное развитие [15].

Предположение авторов исследования о влиянии аннексина, дисферлина и фибронектина на большую сохранность мембран замороженных сперматозоидов было основано на высоких уровнях экспрессии генов этих белков в сперме в опытных образцах по сравнению с контрольными [12].

Следовательно, ADSC поддерживали механизмы восстановления в сперме, взаимодействуя со сперматозоидами посредством выработки различных биологически активных веществ, которые являются неотъемлемой частью механизмов репарации. Дальнейшие исследования в этом направлении необходимы для определения других факторов, секретируемых ADSC, которые могут играть активную роль в сохранении качества спермы после криоконсервации.

Дальнейшие исследования *in vivo* также помогли бы показать эффективность применения ADSC при криоконсервации спермы. Возможно, использование спермы, дополненной ADSC для искусственного оплодотворения, также может быть полезным в решении проблем, связанных с женским репродуктивным трактом, ввиду их регенеративной и мультипотентной природы [12].

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Экзосомы, микровезикулы (МВ) – это микроскопические внеклеточные везикулы (ВВ) диаметром в несколько нанометров, выделяемые в межклеточное пространство клетками различных тканей. Существует несколько типов ВВ, различающихся по происхождению, размерам и т.д. (табл. 1). Известно, что ВВ осуществляют связь между клетками, поскольку могут переносить белки, нуклеиновые кислоты и липиды, опосредуя паракринный механизм регуляции жизнедеятельности тканей или клеток реципиента [16]. А также МВ, секретируемые МСК участвуют в регенерации поврежденных эндогенных клеток посредством перемещения трофических и регуляторных молекул [17].

В исследованиях, проведенных Qatag с соавт. показано, что экзосомы, полученные из МСК-ЖТ, улучшают качество спермы собак после оттаивания при совместной криоконсервации [18].

Добавление оптимальной концентрации экзосом (50 мкг/мл) значительно увеличивало подвижность и долю живых сперматозоидов после оттаивания. При этом процент сперматозоидов с неповрежденной плазматической мембраной был статистически выше в образцах с добавлением экзосом, чем в контрольных.

Оценка мРНК после оттаивания показала значительно более высокий уровень экспрессии генов, связанных с восстановлением плазматиче-

ской мембраны (*ANX1, DYSF, FN1*), компонентов хроматина (*H3, HMGB1*), с одновременной более низкой экспрессией гена, связанного с производством активных форм кислорода в опытных образцах, чем в контрольных образцах спермы собак. По результатам теста на проникновение в слизь была показана гиперактивация обработанной экзосомами спермы. При этом значительно большее количество обработанных сперматозоидов проникло на глубину 1 и 3 см, чем в контрольной группе. Тест на проникновение в слизь показывает способность сперматозоидов проникать в суррогатную цервикальную слизь и обычно используется для оценки оплодотворения *in vitro* и *in vivo* и частоты беременности. Авторы считают, что описанные эффекты обусловлены экзосомальными белками, которые защищают сперму от окислительного повреждения, а также индуцируют восстановление мембран и хроматина [18].

Mokarizadeh с соавт. [19] показали, что добавление в образцы спермы естественных МВ, полученных из МСК костного мозга крыс, приводит к повышению качества криоконсервированной спермы крыс. При этом происходит появление и/или увеличение экспрессии молекул поверхностной адгезии CD54, CD106, CD44 и CD29. Эти результирующие изменения экспрессии белков клеточной мембраны сперматозоида, вероятно, являются прямым следствием включения МВ, содержащих молекулы адгезии (как на транслируемом уровне мРНК, так и на уровне белка), в мембрану половых клеток. При этом повышенная экспрессия CD54, CD106, CD29 и CD44 в значительной степени зависит от количества МВ, используемых при криоконсервации. Функциональные последствия таких изменений экспрессии могут влиять на улучшение адгезивных свойств сперматозоидов, а также на повышение чувствительности к паракринной и контактной сигнализации с яйцеклетками [19].

Однако не все экзосомы, полученные из различных типов клеток, обладают одинаковым криозащитным эффектом при замораживании со сперматозоидами. Согласно исследованию Mahiddine и соавт. [20] экзосомы МСК амниотической мембраны собак не обладают криопротекторными свойствами по отношению к сперматозоидам, по крайней мере при использовании их в качестве добавок в концентрации 2 мкг/мл и ниже. Необходимо отметить также отсутствие отрицательного влияния экзосом из МСК амниотической мембраны на сперматозоиды собак при криоконсервации.

Согласно литературным данным, экзосомы могут действовать на одну и ту же ткань по-разному в зависимости от их концентрации и прохождения клеток – доноров экзосом [21]. Вероятнее всего, это зависит от содержания веществ в меж-

Таблица 1. Классификация внеклеточных везикул

Внеклеточные везикулы	Размер, нм	Особенности образования	Внутреннее содержание	Предполагаемые функции
Апоптотические тельца	1000–5000	Формируются на терминальных стадиях клеточной гибели при фрагментации клетки на части, окружены клеточной мембраной. Отличительной чертой апоптотических телец от других типов внеклеточных везикул является проницаемая мембрана	Геномная ДНК, целые органеллы, рРНК. Основной маркер – аннексин 5	Осуществляют межклеточное взаимодействие. Могут опосредовать горизонтальный перенос ДНК, РНК и рассматриваться как переносчики сигналов между клетками
Микровезикулы	100–1000	Образуются путем выпячивания и отпочкования участков плазматической мембраны клетки	В целом близки к экзосомам. Есть данные о содержании в них различных белков клеточной адгезии, компонентов цитоскелета, матричных металлопротеиназ, гликопротеинов, митохондриальных, центросомных и рибосомных белков. Отсутствуют обязательные компоненты экзосом – тетраспанины, флотилины, аннексины и белки ESRT. Основные маркеры – CD40, CD62	Осуществляют межклеточное взаимодействие. Предполагается их роль в качестве биологических маркеров заболеваний
Экзосомы	30–150	Мембранная частица эндоцитозного происхождения, образующаяся внутри мультивезикулярных эндосомальных телец	Содержимое экзосом отражает цитозольный состав клеток-доноров: неспецифические и тканеспецифические белки, различные виды РНК. Характерно присутствие большего количества онкогенных белков и влияние на пролиферацию и миграцию клеток в большей степени, чем для микровезикул. Основные маркеры – CD63, CD9, Alix, TSG101	Осуществляют межклеточное взаимодействие

клеточных везикулах, так как важнейшее их свойство — это регуляция экспрессии генов в клетках-мишенях при слиянии с мембраной и выделении своего содержимого в цитоплазму [22]. В настоящее время доказано, что экзосомы, как и другие ВВ, переносят клеточно-специфические компо-

ненты клетки-источника в клетку-реципиент [23]. Известно, что МСК амниотической мембраны способны к дифференцировке и трансдифференцировке как МСК из других тканей. Но обладают уникальными иммунофенотипическими характеристиками, которые отличают эти клетки от

других МСК. Поскольку амниотическая мембрана имеет эмбриональное происхождение, уровни экспрессии эмбриональных маркеров, включая OCT3/4, SOX2, Klf4, c-Myc, Nanog и Lin28, в МСК амниотической мембраны намного выше, чем у МСК костного мозга. Также эти клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности, такие как L-щелочная фосфатаза, TRA-2-39, OCT4, Nanog, SOX2 и Rex1, которые специфически экспрессируются в эмбриональных и зародышевых стволовых клетках [24]. Существует мнение, что МСК амниотической мембраны являются более примитивными, чем МСК, обнаруженные в костном мозге [25]. Отсутствие полезных эффектов экзосом из МСК амниотической мембраны может быть объяснено типом клеток и, следовательно, факторами, которые они секретируют [26].

Неоднозначным влиянием на сохранность сперматозоидов после криоконсервации обладают и ВВ семенной плазмы у разных видов животных. ВВ вырабатываются в мужских половых путях, включая придаток яичка и простату. Показано, что ВВ участвуют в регуляции функции сперматозоидов посредством связывания и последующего слияния с их мембраной, осуществляя интеграцию цитозольного и мембранного составляющего в половую клетку. В настоящий момент еще четко не определены все необходимые условия для связывания и слияния этих везикул с клеткой-реципиентом. Кроме того, достоверно установлено, что перенос молекул белка от везикул семенной плазмы к сперматозоидам возможен только при наличии определенного значения pH, температуры и в присутствии цинка [27].

Результаты исследований ряда авторов показали, что экзосомы семенной плазмы (ЭСП) обладают криопротекторным действием по отношению к сперматозоидам [22, 28]. Исследования Du с соавт. продемонстрировали, что ЭСП хряка могут усиливать антиоксидантные свойства сперматозоидов, снижать содержание малонового диальдегида, поддерживая целостность плазматической мембраны сперматозоидов, улучшать подвижность сперматозоидов, а также подавлять преждевременную капацитацию. Флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопия продемонстрировали, что экзосомы напрямую связываются с мембраной головки сперматозоида. По мнению исследователей, это улучшает целостность плазматической мембраны сперматозоида, но не влияет на капацитацию, индуцированную *in vitro* [29].

Известно, что существует определенная избирательность в связывании ЭСП со сперматозоидами, зависящая от специфичности сайтов связывания. Так, Zhou и соавт. показали, что экзосомы из придатка семенника имеют определенное сродство к постакросомальной области головки

сперматозоида [30], тогда как экзосомы, полученные из вспомогательных половых желез, будут иметь сродство ко всем доменам клеточной мембраны головки: акросомному гребню, акросоме и постакросоме [20]. Исследователи считают, что экзосомы, которые связываются с головкой сперматозоида, будут влиять на емкость, акросомальную реакцию и способность слияния с ооцитом, тогда как те, которые сливаются со средней и основной частью хвоста, будут оказывать большее влияние на активность митохондрий, энергетический метаболизм и подвижность [31].

В то же время Goericke-Peschab с соавт. продемонстрировали отсутствие положительного эффекта МВ семенной плазмы на качество сперматозоидов собак как при их совместной криоконсервации, так и при добавлении МВ после оттаивания образцов [32]. В контрольных образцах эякулятов МВ удаляли для получения чистой спермы. Проведенные эксперименты показали кратковременное благотворное влияние МВ только на скоростные параметры сперматозоидов после оттаивания по сравнению с группой контроля. Однако этот эффект нивелировался через 30 мин после размораживания. В своих выводах ученые поставили под сомнение целесообразность использования МВ семенной плазмы при криоконсервации с целью повышения качества сперматозоидов собаки после размораживания [32].

Данные, полученные Ferraz с соавт., демонстрируют возможность применения ВВ домашних животных одного вида для успешной криоконсервации образцов спермы редких и исчезающих животных другого вида [33]. Авторами установлено, что ВВ из яйцеводов собак и кошек улучшают состояние сперматозоидов красного волка и гепарда после криоконсервирования. В частности, сперма красного волка и гепарда, размороженная с ВВ из яйцеводов собаки и кошки, имела больше неповрежденных акросом, чем контрольные образцы. Кроме того, сперму красного волка в присутствии ВВ из яйцевода собаки лучше поддерживала подвижность сперматозоидов с течением времени. Однако такого эффекта не наблюдалось в образцах со сперматозоидами гепарда.

Положительный эффект везикул исследователи объясняют тем, что они несут важные для функции сперматозоидов белки, которые улучшают не только подвижность после оттаивания, но увеличивают сохранность акросом спермы красного волка и гепарда *in vitro*. Результаты проведенной работы показывают, что эти ВВ могут быть ценным инструментом для улучшения условий криохранения спермы у видов, находящихся под угрозой исчезновения [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общепризнанным фактом является то, что сперма разных видов животных обладает разной чувствительностью к криоконсервированию [34]. Успешность криоконсервации сперматозоидов определяется сложным взаимодействием мембраны сперматозоида с семенной плазмой, с разбавителем и подбором приемлемых методов замораживания. Целостность мембраны является очень важной для нормального функционирования сперматозоидов после оттаивания. Потеря поверхностных белков, таких как рецептор прогестерона, особенно из акросомы, может ухудшить качество после оттаивания и оплодотворяющую способность сперматозоида [35]. Следовательно, структурная целостность сперматозоидов является необходимым условием для правильного функционирования и оплодотворения ооцитов и последующее эмбриональное развитие организма [36].

Большинство протоколов замораживания спермы млекопитающих включают удаление семенной плазмы перед криоконсервацией с помощью центрифугирования [37], что практически сводит к минимуму защитное действие антиоксидантных ферментов семенной плазмы от окислительного стресса [38].

При этом биосинтетическая способность сперматозоидов ограничена, что служит главным препятствием для их самовосстановления после повреждения [38]. Однако многие внешние факторы контролируют функцию сперматозоидов, действуя через поверхностные и мембранные компоненты, поэтому ряд исследователей выдвинули гипотезу, что использование МСК/микровезикул при криоконсервации спермы может быть эффективным биологическим подходом для повышения фертильности и жизнеспособности сперматозоидов за счет поддержки механизмов репарации посредством секреции различных белков. Но при использовании МСК и ВВ необходимо учитывать, что стволовые клетки и их производные из различных тканей продуцируют вещества с неодинаковой биоактивностью по отношению к клеткам-реципиентам. Поэтому для МСК и ВВ должны быть разработаны стандарты измерений контроля качества и протоколов безопасности, а также эффективности использования для коммерческих целей при искусственном оплодотворении.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00172 в рамках Программы стра-

тегического академического лидерства Казанского федерального университета ПРИОРИТЕТ-2030.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tao Y., Sanger E., Saewu A., Leveille M.-C. 2020. Human sperm vitrification: The state of the art. *Reprod Biol Endocrinol.* **18** (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00580-5>
2. Ugur M.R., Saber Abdelrahman A., Evans H.C., Gilmore A.A., Hitit M., Arifiantini R.I., Purwantara B., Kaya A., Memili E. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front. Vet. Sci.* **6**, 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
3. Ombelet W., Van Robays J. 2015. Artificial insemination history: Hurdles and milestones. *Facts Views Vis. Obgyn.* **7** (2), 137–143.
4. Saadeldin I.M., Khalil W.A., Alharbi M.G., Lee S.H. 2020. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals (Basel).* **10** (12), 2281. <https://doi.org/10.3390/ani1012281>
5. Thongphakdee A., Sukparangsi W., Comizzoli P., Chatdarong K. 2020. Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology.* **150**, 360–373. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.004>
6. Yanez-Ortiz I., Catalan J., Rodriguez-Gil J.E., Miro J., Yeste M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals. Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **246**, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
7. Zakirova E.Y., Shalimov D.V., Garanina E.E., Zhuravleva M.N., Rutland C.S., Rizvanov A.A. 2019. Use of biologically active 3D matrix for extensive skin defect treatment in veterinary practice. *Front. Vet. Sci.* **6**, 76. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00076>
8. Naumenko E., Zakirova E., Guryanov I., Akhatova F., Sergeev M., Valeeva A., Fakhrullin R. 2021. Composite biodegradable polymeric matrix doped with halloysite nanotubes for the repair of bone defects in dogs. *Clays Clay Miner.* **69**, 522–532.
9. Theerakittayakorn K., Thi Nguyen H., Musika J., Kunkanjanawan H., Imsoonthornruksa S., Somredngan S., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. 2020. Differentiation induction of human stem cells for corneal epithelial. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (21), 7834. <https://doi.org/10.3390/ijms21217834>
10. Jovic D., Yu Y., Wang D., Wang K., Li H., Xu F., Liu C., Liu J., Luo Y. 2022. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy. *Stem Cell. Rev. Rep.* **18** (5), 1525–1545. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10369-1>
11. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. 2014. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mes-

- enchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy*. **16**, 579–585.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.017>
12. Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J. 2020. Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **10** (1), 7034.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61803-8>
 13. Sun J., Shao Z., Yang Y., Wu D., Zhou X., Yuan H. 2012. Annexin I protects against apoptosis induced by serum deprivation in transformed rat retinal ganglion cells. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 5543–5551.
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1358-1>
 14. Lennon N.J., Kho A., Bacskai B.J., Perlmutter S.L., Hyman B.T., Brown R.H., Jr. 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J. Biol. Chem.* **278**, 50466–50473.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307247200>
 15. To W.S., Midwood K.S. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **4**, 21.
<https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-21>
 16. Zakirova E.Y., Aimaletdinov A.M., Malanyeva A.G., Rutland C.S., Rizvanov A.A. 2020. Extracellular vesicles: New perspectives of regenerative and reproductive veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.* **7**, 594044.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.594044>
 17. Ratajczak M.Z., Ratajczak J. 2020. Extracellular microvesicles/exosomes: Discovery, disbelief, acceptance, and the future. *Leukemia.* **34** (12), 3126–3135.
<https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>
 18. Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J. 2019. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals (Basel).* **9** (11), 865.
<https://doi.org/10.3390/ani9110865>
 19. Mokarizadeh A., Rezvanfar M.A., Dorostkar K., Abdollahi M. 2013. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: Trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod. Toxicol.* **42**, 78–84.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.07.024>
 20. Mahiddine F.Y., Qamar A.Y., Kim M.J. 2020. Canine amniotic membrane derived mesenchymal stem cells exosomes addition in canine sperm freezing medium. *J. Animal Reprod. Biotechnol.* **35** (3), 268–272.
<https://doi.org/10.12750/JARB.35.3.268>
 21. Venugopal C., Shamir C., Senthilkumar S., Babu J.V., Sonu P.K., Nishtha K.J., Rai K.S., K.S., Dhanushkodi A. 2017. Dosage and passage dependent neuroprotective effects of exosomes derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells: An in vitro analysis. *Curr. Gene Ther.* **17** (5), 379–390.
<https://doi.org/10.2174/1566523218666180125091952>
 22. Агейкин А.В., Горелов А.В., Усенко Д.В., Мельников В.Л. 2021. Экзосомы крови как новые биомаркеры инфекционных заболеваний. *Медицинское обозрение.* **5** (11), 744–748.
<https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-11-744-748>
 23. Chen J., Li P., Zhang T., Xu Z., Huang X., et al. 2021. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 811971.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971>
 24. Koike C., Zhou K., Takeda Y., Fathy M., Okabe M., Yoshida T., Nakamura Y., Kato Y., Nikaïdo T. 2014. Characterization of amniotic stem cells. *Cell Reprogram.* **16** (4), 298–305.
<https://doi.org/10.1089/cell.2013.0090>
 25. Kazemnejad S., Khanmohammadi M., Zarnani A-H., Bolouri M.R. 2016. *Characteristics of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane: A potential candidate for stem cell-based therapy. In perinatal tissue-derived stem cells: Alternative sources of fetal stem cells.* Ed: B. Arjmand. Springer International Publishing, p. 137–169.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46410-7_7
 26. Bosch S., de Beaurepaire L., Allard M., Mosser M., Heichette C., Chrétien D., Jegou D., Bach J.M. 2016. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryo-damage. *Sci. Rep.* **6**, 36162.
<https://doi.org/10.1038/srep36162>
 27. Сысоева А.П., Макарова Н.П., Краевая Е.Е. 2021. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека. *Клин. эксп. морфология.* **10** (4), 5–13.
<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.5-13>
 28. Mahdavinezhad F., Sadighi Gilani M.A., Gharaei R., Ashrafnezhad Z., Valipour J., Shabani Nashtaei M., Amidi F. 2022. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online.* **45** (2), 341–353.
 29. Du J., Shen J., Wang Y., Pan C., Pang W., Diao H., Dong W. 2016. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget.* **7**, 58832–58847.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11315>
 30. Zhou W., Stanger S.J., Anderson A.L., Bernstein I.R., De Iulius G.N., McCluskey A., McLaughlin E.A., Dun M.D., Nixon B. 2019. Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions. *BMC Biol.* **17** (1), 35.
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0653-5>
 31. Machtinger R., Laurent L.C., Baccarelli A.A. 2016. Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum. Reprod. Update.* **22**(2), 182–193.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv055>
 32. Goericke-Pesch S., Hauck S., Failing K., Wehrend A. 2015. Effect of seminal plasma vesicular structures in canine frozen-thawed semen. *Theriogenology.* **84**, 1490–1498.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.033>
 33. de Almeida Monteiro Melo Ferraz M., Nagashima J.B., Noonan M.J., Crosier A.E., Songsasen N. 2020. Oviductal extracellular vesicles improve post-thaw sperm function in red wolves and cheetahs. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(10), 3733.
<https://doi.org/10.3390/ijms21103733>
 34. Bencharif D., Dordas-Perpinya M. 2020. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last

- 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. **55** (2), 61. <https://doi.org/10.1111/rda.13629>
35. Cheng F.P., Wu J.T., Tsai P.S., Chang C.L., Lee S.L., et al. 2005. Effects of cryo-injury on progesterone receptor[s] of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology*. **64** (4), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.021>
36. Liu S., Li F. 2020. Cryopreservation of single-sperm: Where are we today? *Reprod. Biol. Endocrinol.* **18** (1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00607-x>
37. de Oliveira R.A., Wolf C.A., de Oliveira Viu M.A., Gambarini M.L. 2013. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Equine J. Vet.* **33**, 1148–1152. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.05.001>
38. Peris-Frau P., Soler A.J., Iniesta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Medina-Chávez D.A., Fernández-Santos M.R., García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Montoro V., Garde J.J. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. Journal Mol. Sci.* **21** (8), 2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>

Modern Trends of the Application of Stem Cells and Their Derivatives during Cryopreservation of Animal Sperm

M. A. Tambovsky¹, *, A. M. Aimaletdinov¹, E. Yu. Zakirova¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

*e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Cryopreservation is an important method for preserving sperm from various organisms. However, freezing gametes often leads to various types of cell damage, which affects the outcome of artificial insemination. After thawing, spermatozoa usually have ultrastructural, biochemical and functional changes such as cell membrane and chromatin damage and oxidative stress. Since spermatozoa have limited biosynthetic capacity, they have a low capacity to regenerate. The current trend is to improve the sperm cryopreservation regime using natural extracellular vesicles and stem cells. Extracellular vesicles and stem cells have a potential regenerative effect, as they contain various biologically active molecules affecting sperm repair. This review focuses on current strategies to improve sperm health after cryopreservation. In particular, this review describes the results of studies on the use of extracellular vesicles and stem cells as cryoprotectors during freezing and thawing of spermatozoa.

Keywords: cryoconservation, cryodamage, spermatozoa, extracellular vesicles, stem cells

УДК 577.35+612.17

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СИНТЕЗА СЕРОТОНИНА 5-ОКСИТРИПТОФАНА НА ВПСП, РЕГИСТРИРУЕМЫЕ В ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА

© 2023 г. А. И. Арсланов^{a, *}, Д. И. Силантьева^a, В. В. Андрианов^{a, b},
И. Б. Дерябина^a, Х. Л. Гайнутдинов^{a, b}

^aКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^bКазанский физико-технический институт КазНЦ РАН, Казань, 420029 Россия

*e-mail: arslanov-1999@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 24.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Проведено количественное исследование подпороговых возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП), регистрируемых внутриклеточно, в гигантских премоторных интернейронах виноградной улитки после формирования условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии при повышенном уровне серотонина в организме. Результаты показывают достоверное увеличение количества низкоамплитудных ВПСП с амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ в премоторных гигантских интернейронах оборонительного поведения после обучения при повышенном уровне серотонина. Наблюдаемое увеличение количества ВПСП может говорить либо об увеличении количества потенциалов действия в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуд ВПСП, ранее не подававшихся обнаружению.

Ключевые слова: нейрон, обучение, ВПСП, синаптическая пластичность, мембранный потенциал, серотонин

DOI: 10.31857/S0233475523050031, **EDN:** OJJWQQ

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин является одним из широко распространенных и наиболее изученных медиаторов нервной системы [1, 2]. Он играет важную роль в процессах обучения и формирования памяти, участвует в модуляции силы синаптической связи [3–6]. Целью данной работы было исследование изменений фоновой (подпороговой) электрической активности в гигантских премоторных интернейронах виноградной улитки после ассоциативного обучения при воздействии предшественника синтеза серотонина 5-окситриптофана (5-НТР), приводящего к повышению уровня серотонина в организме.

Регистрация подпороговой фоновой активности нейрона позволяет составить картину суммарной электрической активности входящих синапсов. Для реализации данной цели была поставлена задача: провести анализ изменения фоновой активности премоторных интернейронов при формировании условного рефлекса авер-

зии к определенному виду пищи у виноградной улитки после аппликации 5-НТР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование условного оборонительного рефлекса аверзии к пище (УОР). Для данного эксперимента были выбраны здоровые на вид и подвижные брюхоногие легочные моллюски *Helix pomatia*. До начала эксперимента в течение 14 дней данные животные поддерживались в активном состоянии. Влажность и температура, необходимая для поддержания активного состояния, контролировалась в террариуме с помощью измерительных приборов. В качестве пищи использовалась морковь. За 3 дня до начала и на протяжении всего времени эксперимента животные не получали пищи, что является стандартной процедурой при формировании оборонительного рефлекса аверзии к определенному виду пищи и связано с необходимостью поддержания моллюсков в активном состоянии [4]. Далее животные были поделены на четыре группы: экспериментальная

группа – 5-НТР + УОР, экспериментальная группа – 5-НТР, экспериментальная группа – УОР, контрольная группа (интактные).

Животным первой и второй экспериментальной группы в течение 4 дней инъекцировали предшественник синтеза серотонина 5-НТР ($n = 5$) в концентрации 1 ммоль/л. Фармакологический эффект 5-НТР в организме проявляется в значительном повышении содержания серотонина уже через 30 мин после инъекции с достижением максимальной величины через 1ч и продолжительностью повышенного содержания серотонина в несколько часов [7].

Ежедневно у животных первой экспериментальной группы через 1 ч после инъекции 5-НТР вырабатывали УОР. У животных третьей группы вырабатывали УОР без предварительной инъекции 5-НТР. УОР вырабатывали с использованием следующей методики: в качестве условного стимула предъявляли кусок огурца, который подносили на металлическом стержне к оральной области улитки. В момент первого жевательного движения виноградной улитки через стержень пропускали ток величиной в 1–2 мА, что служило безусловным стимулом, вызывающим оборонительную реакцию. Между данными сочетаниями пищи и тока делали паузы, длительностью 5–7 мин. В день проводилось 2 сессии по 10 сочетаний в каждой. Для подтверждения сформированности рефлекса животному предоставлялся огурец в течение 3 мин и если улитка отказывалась брать кусок огурца в течение этого периода, то такую реакцию принимали за отказ от данного вида пищи. Рефлекс в среднем вырабатывался после предъявления 80 сочетаний стимулов за 4 дня. Животные контрольной группы сохранялись интактными и содержались в одинаковых условиях с экспериментальными группами.

Исследования были проведены на 22 улитках: 1) группа обученных улиток с аппликацией 5-НТР – группа улиток, которые были инъекцированы 5-НТР и у которых был сформирован рефлекс аверзии на пищу – 5 улиток ($n = 9$ зарегистрированных нейронов); 2) группа с аппликацией 5-НТР – группа улиток, которые были инъекцированы 5-НТР – 5 улиток ($n = 9$ зарегистрированных нейронов); 3) группа обученных улиток – группа улиток, у которых был сформирован условно-оборонительный рефлекс – 5 улиток ($n = 7$ зарегистрированных нейронов); 4) контрольная группа – группа интактных животных – 5 улиток ($n = 7$ зарегистрированных нейронов).

Все экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил и норм этического комитета Казанского федерального университета.

Электрофизиологическая установка. Электрофизиологические измерения проводились по

стандартной методике при комнатной температуре с применением одного или двух внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, имевших сопротивление 5–25 МОм и заполненных раствором 2.5 М КСl [8–10]. Раствор микроэлектрода соединялся с регистрирующей аппаратурой посредством проводящей ток цепочки “агаровый мостик–хлорсеребряный электрод”. Индифферентный электрод представлял собой симметричную цепочку, агаровый конец которой опускался в омывающий препарат раствор. Подведение микроэлектродов к клеткам проводилось под визуальным контролем с помощью бинокулярного микроскопа. Запись производилась с помощью компьютера со встроенным аналого-цифровым преобразователем.

Для регистрации электрических характеристик нервных клеток используют микроэлектроды. Основным недостаток металлических и графических микроэлектродов при размерах 0.5 мкм – хрупкость или малая жесткость кончика. Это не позволяет использовать их для внутриклеточного введения. Поэтому для внутриклеточной регистрации мембранных электрических характеристик наиболее удобными являются стеклянные микроэлектроды [10, 11].

Стеклянный микроэлектрод представляет собой стеклянную микропипетку с диаметром кончика около 0.5 мкм, которая заполняется раствором электролита (для внутриклеточных электродов – 2.5 М раствора КСl). Микроэлектроды готовили из капилляров с наружным диаметром 1.5 мм на специальной микрокузнице. Пригодность микроэлектрода определяется формой, размерами кончика и электрическим сопротивлением. Существуют различные способы заполнения микроэлектродов. Нами использовался способ заполнения через ствол без дополнительных воздействий. Заполнение происходило быстро благодаря нескольким тонким капиллярам внутри микропипетки. Заполненные электроды имели сопротивление 5–25 МОм.

Параметры фоновой активности интернейронов париетального ганглия виноградной улитки. Электрофизиологические измерения проводились по методике регистрации трансмембранного потенциала, позволяющей обнаружить возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) с амплитудой от 0.3 мВ. В ходе эксперимента анализировали синаптический приток в премоторных гигантских интернейронах: LPa2, LPa3, RPa2 и RPa3. ВПСП определялись визуально по характерной форме изменения мембранного потенциала [11]. Параметры, способствующие регистрации ВПСП, были связаны с достижением минимальных шумов, усреднением полученных регистраций с необходимыми параметрами усреднения и подбором оптимальных масштабов отображения

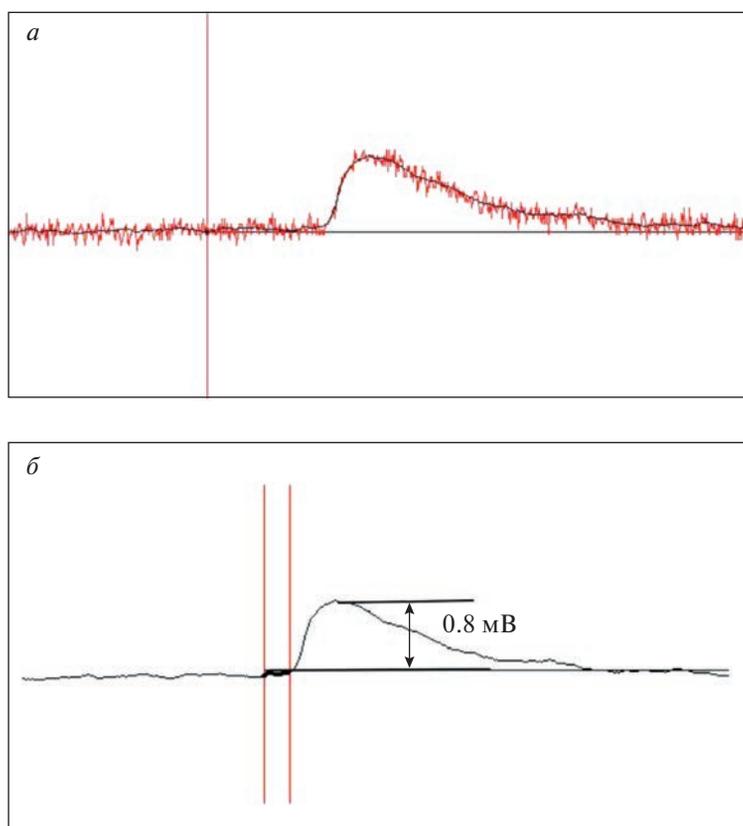


Рис. 1. Пример регистрации ВПСП (а) и способ вычисления его амплитуды (б). Усреднение по 100 точкам при шаге оцифровки сигнала 0.1 мс.

кривых. На основании серий длительных регистраций трансмембранных потенциалов молчащих премоторных нейронов, полученных в эксперименте, была разработана методика, позволяющая количественно оценить суммарный синаптический приток отдельного нейрона на основании регистраций мембранного потенциала длительностью в 30 мин.

Для описания наблюдаемых изменений мембранного потенциала интернейронов были выбраны следующие параметры синаптической фоновой активности интернейронов париетального ганглия: средняя амплитуда и среднее количество ВПСП. В качестве пороговой амплитуды ВПСП была принята величина 0.3 мВ, так как данная величина позволяла уверенно идентифицировать ВПСП на уровне шумов (рис. 1).

Статистическая обработка результатов. В работе приведены средние значения измеряемых величин и стандартные ошибки среднего. Достоверность отличий средних значений параметров между контрольной и экспериментальной группой проверяли при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Была использована программа SigmaPlot 11. Статистическая значимость оценивалась по $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В фоновой электрической активности премоторных интернейронов наблюдались одиночные ВПСП различной амплитуды. Был проведен анализ частоты появления ВПСП в исследуемых нейронах у групп интактных животных (количество нейронов $n = 7$), у животных с УОР (количество нейронов $n = 7$) животных после инъекции 5-НТР (количество нейронов $n = 9$) и у животных, которых обучали после инъекции 5-НТР (количество нейронов $n = 9$). Все наблюдаемые ВПСП были разделены по величине их амплитуды на интервалы: 1) от 0.3 до 0.5 мВ, 2) от 0.5 до 1.0 мВ, 3) от 1.0 до 1.5 мВ, 4) от 1.5 до 2.0 мВ, 5) от 2.0 мВ до порога. Было найдено, что частота появления ВПСП амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ значимо ($p < 0.05$) увеличивается в группе животных, которых обучали после инъекции 5-НТР (рис. 2). Также наблюдается недостоверная тенденция к увеличению количества ВПСП у группы 5-НТР + УОР по сравнению с группами 5-НТР и УОР. Достоверных изменений в частоте появлений ВПСП других амплитуд обнаружено не было (рис. 3–5).

Таким образом, наши эксперименты показали, что инъекция 5-НТР с последующим обучением у

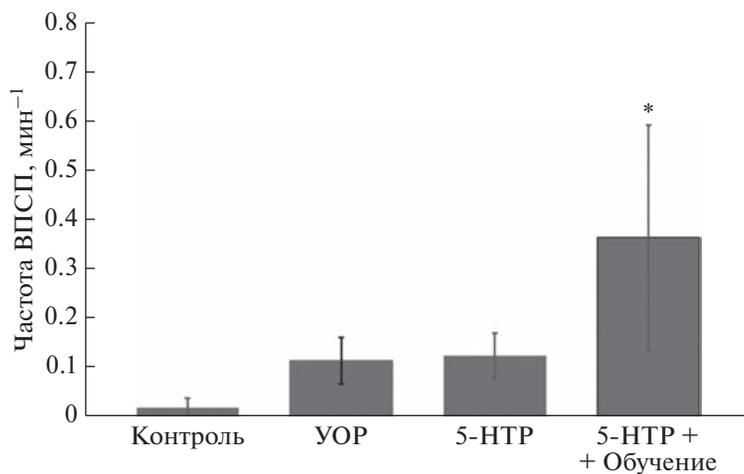


Рис. 2. Среднее значение количества одиночных ВПСП с амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ; * – статистически значимое отличие группы от контроля при $p < 0.05$.

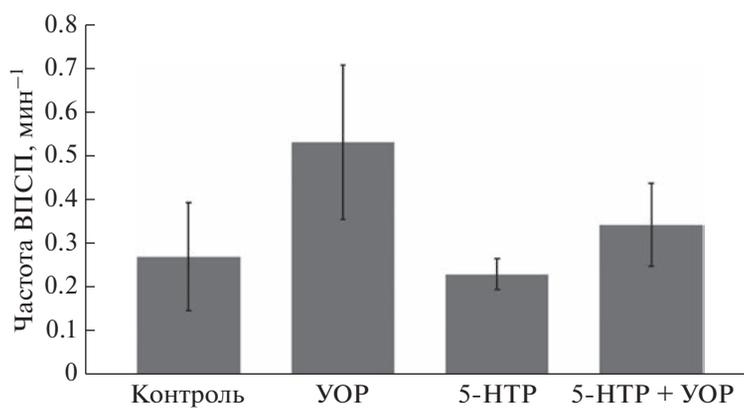


Рис. 3. Среднее значение количества одиночных ВПСП с амплитудой от 0.5 до 1 мВ.

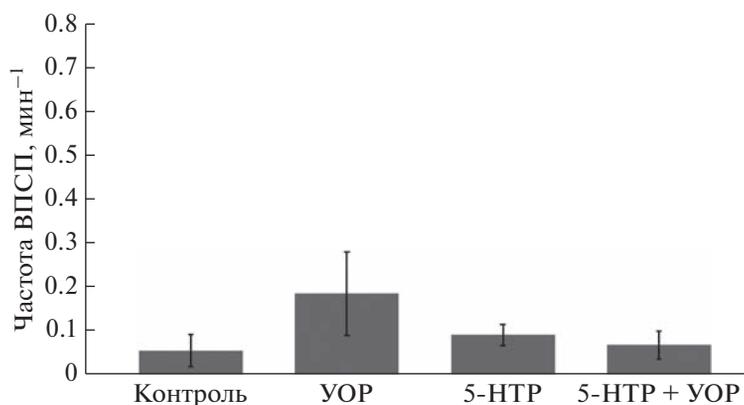


Рис. 4. Среднее значение количества одиночных ВПСП с амплитудой от 1 до 1.5 мВ.

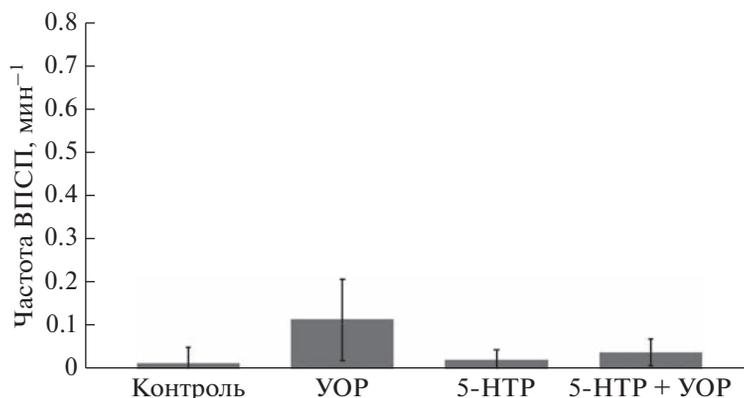


Рис. 5. Среднее значение количества одиночных ВПСП с амплитудой от 1.5 до 2 мВ.

виноградной улитки приводит к достоверному увеличению частоты появлений ВПСП амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ. При этом наблюдалась недостоверная тенденция к увеличению количества ВПСП этого интервала амплитуд после отдельной выработки условного оборонительного рефлекса аверзии на пищу, а также в группе с отдельными инъекциями 5-НТР. Это увеличение количества низкоамплитудных одиночных ВПСП может говорить либо об увеличении количества потенциалов действия в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуды ВПСП, ранее не поддававшихся обнаружению. Предпринятый нами анализ подпороговой фоновой активности молчащих премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки позволил найти изменения в синаптическом входе, связанные с воздействием предшественника синтеза серотонина 5-НТР, а также с выработкой условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии на фоне аппликации 5-НТР.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Соответствие принципам этики. Все экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил и норм этического комитета Казанского федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Losonczy A., Makara J.K., Magee J.C. 2008. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *J. Nature*. **27** (452), 436–441.
- Lisman J., Cooper K., Sehgal M., Silva A.J. 2018. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat. Neurosci.* **21** (3), 309–314.
- Bliss T.V., Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **2** (232), 331–356.
- Балабан П.М., Коршунова Т.А. 2011. Сетевые, клеточные и молекулярные механизмы пластичности в простых нервных системах. *Успехи физиол. наук.* **42** (4), 3–19.
- Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х. 2011. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти. *Успехи физиол. наук.* **42** (1), 33–50.
- Andrianov V.V. Bogodvid T.K., Deryabina I.B. 2015. Modulation of defensive reflex conditioning in snails by serotonin. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 279.
- Науменко Е.В., Попова Е.К. 1975. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Новосибирск: Наука. 220 с.
- Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х., Тарасова Е.А. 1998. Электрические характеристики командных и моторных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса и формирования долговременной сенситизации у улиток. *Журн. высш. нервн. деят.* **48** (6), 1004–1013.
- Deryabina I.B., Muranova L.N., Andrianov V.V., Gainutdinov K.L. 2018. Impairing of serotonin synthesis by *p*-chlorphenylalanine prevents the forgetting of contextual memory after reminder and the protein synthesis inhibition. *Front. Pharmacol.* **9**, 607.
- Палихова Т.А., Маракуева И.В., Аракелов Г.Г. 1992. Моно- и полисинаптические связи между идентифицированными нейронами в системе пассивно-оборонительного рефлекса виноградной улитки. *Журн. высш. нервн. деят.* **42** (6), 1170–1179.
- Балабан П.М., Захаров И.С. 1992. *Обучение и развитие. Общая основа двух явлений.* М.: Наука. 150 с.

Action of Serotonin Precursor Synthesis 5-Oxytryptophan on EPSP Recorded in Premotor Interneurons of Snail after Formation of Conditioned Defensive Reflex

A. I. Arslanov^{1, *}, D. I. Silantyeva¹, V. V. Andrianov^{1, 2}, I. B. Deryabina¹, Kh. L. Gainutdinov^{1, 2}

¹*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

²*Zavoisky Physical-Technical Institute of the Federal Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, 420029 Russia*

**e-mail: arslanov-1999@mail.ru*

A quantitative study of subthreshold excitatory postsynaptic potentials (EPSP) recorded intracellularly in giant premotor interneurons of the terrestrial snail was carried out after the formation of a conditioned defensive reflex of food aversion in snails with increased level of serotonin. The results showed a significant increase in the number of low-amplitude EPSP with an amplitude from 0.3 to 0.5 mV in the giant premotor interneurons of defensive behavior after learning and increasing the level of serotonin. The observed increase in the number of EPSP may indicate either an increase in the number of action potentials in the corresponding presynaptic neurons or an increase in the amplitudes of the EPSP that were previously undetectable.

Keywords: neuron, training, EPSP, synaptic plasticity, membrane potential, serotonin

УДК [57.088.6+57.085.23::612.112.94:]577.121.7+57.083.37::547.874]

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 2-(ХЛОРДИНИТРОМЕТИЛ)-4-МЕТОКСИ-6-(4-МЕТИЛПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-1,3,5-ТРИАЗИНА ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ

© 2023 г. П. В. Ильясов^а, Л. В. Лимарева^а, А. И. Сизова^{а, *},
В. А. Заломленков^б, А. П. Курицына^а

^аСамарский государственный медицинский университет Минздрава России,
г. Самара, 443099 Россия

^бСамарский государственный технический университет,
г. Самара, 443100 Россия

*e-mail: a.i.sizova@samsmu.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Метод оценки метаболических характеристик интактных клеток на основе регистрации их дыхательной активности использовали для отслеживания реакции лимфоцитов на потенциальный фармакологический агент 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин. Использованный метод обеспечил выполнение анализа цитотоксического действия тестируемого соединения, что позволило определить его пороговые токсические концентрации для лимфоцитов человека. Показано, что полученные результаты согласуются с данными эталонного метода – МТТ-теста цитотоксичности.

Ключевые слова: цитотоксичность, дыхательная активность, лимфоциты, противоопухолевый агент, электрод Кларка, триазин

DOI: 10.31857/S0233475523050055, **EDN:** OETRRZ

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что клетки живых организмов характеризуются широким разнообразием метаболических путей и ферментов, которые их и осуществляют. Активность этих ферментов обеспечивает жизнеспособность клеток и опосредует все происходящие в них процессы. Особенности этих процессов отражают состояние клеток и могут использоваться в целях диагностики и прогнозирования этого состояния при воздействии различных факторов (в том числе токсических соединений), что находит применение в различных областях биологии и медицины [1].

Почти любой процесс окисления и утилизации органических веществ в живых клетках в конечном итоге замыкается на компонентах электрон-транспортной дыхательной цепи. Это приводит к поглощению кислорода клетками из окружающей среды. При этом уровень такого поглощения кислорода пропорционален метаболической активности клеток и зависит как от используемого субстрата, так и от состояния клеток и наличия в них тех или иных ферментов [2]. Очевидно, что клетки различных организмов или тканей, а так-

же клетки, подвергавшиеся или не подвергавшиеся какому-либо значимому воздействию, будут характеризоваться качественными и количественными различиями активности в отношении набора определенных субстратов. Следовательно, поглощение кислорода при разложении и трансформации субстратов клетками также можно использовать для оценки биохимических особенностей этих клеток и их состояния в целом.

Электрод Кларка широко используется для измерения концентрации кислорода в физиологических жидкостях, а также для разработки ферментных и клеточных биосенсоров – устройств на биологической основе для измерения концентрации определенных веществ в среде. При формировании таких биосенсоров биологический материал (фермент или клетки), способный окислять анализируемое вещество с потреблением кислорода, располагают в непосредственной близости от рабочей зоны электрода Кларка. При наличии анализируемого вещества в среде оно контактирует с этим ферментом или клетками, окисляется ими, при этом концентрация кислорода снижается пропорционально интенсивности такого окисления, что и регистрирует электрод [3, 4].

Однако, как следует из вышеизложенного, подобные устройства можно использовать не только для химического анализа компонентов среды, но и для оценки состояния или гибели клеток.

Первые работы, в которых описаны аналоги такого подхода, относятся к 60-м годам прошлого века. В то время ряд авторов измеряли поглощение кислорода в выделенных митохондриях и лизатах клеток для определения активности некоторых ферментов [5–8]. Этот подход был близок к методике, использованной в данной работе, однако авторы всех этих работ выполняли анализ в клеточном лизате или выделенных органеллах, а не в живых клетках. В дальнейшем исследователи стали использовать в этих целях другие методы — спектрофотометрию, масс-спектрометрию, хроматографию и т.д., а основной областью применения исследований дыхательной активности клеток стала разработка биосенсоров и биотопливных ячеек [9–12]. В настоящее время использование электрохимической регистрации кислорода в биохимии сводится к частным аспектам, связанным с дыхательной активностью клеток [13–17]. При этом авторы, как правило, считают регистрируемую активность следствием процессов, происходящих только в митохондриях, и не связывают ее с активностью клетки в целом [18–22]. Вместе с тем, сфера применения такого подхода может быть существенно расширена с учетом того, что он предоставляет возможность количественного измерения процессов, происходящих в живых интактных клетках, в режиме реального времени, что невозможно для большинства других методов, входящих в арсенал современной биохимии.

В ряде работ для оценки токсического действия различных факторов на клетки используются так называемые сенсоры токсичности — биосенсорные устройства, в которых применяют клетки, гибнущие или снижающие свою активность при контакте с исследуемым веществом. Описано, например, использование таких сенсоров на основе бактериальных клеток для тестирования эффективности антибиотиков и генотоксичных веществ [23, 24]. Сенсоры токсичности могут быть основаны как на оценке дыхательной активности (в том числе посредством электрода Кларка) [25], так и на других принципах, например, измерении биолюминесценции [26]. Следует отметить, что сенсоры токсичности применяют не только для тестирования лекарственных препаратов, но и при выявлении неблагоприятных факторов в экосистемах в природоохранных целях [27].

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что дыхательную активность клеток можно рассматривать как показатель интегральной активности их аэробных ферментных систем при

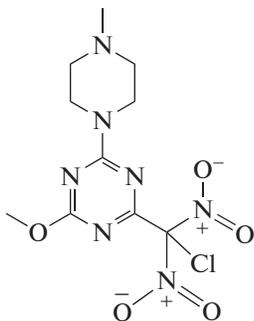
введении различных субстратов, в том числе токсических соединений и, в частности, потенциальных противоопухолевых агентов. Снижение метаболической активности при воздействии токсического фактора в таком случае будет являться показателем степени и интенсивности гибели или повреждения клеток. Подобный подход, основанный на измерении потребления кислорода и выделения кислых продуктов, использован компанией Agilent в анализаторе Seahorse XF для исследования различных аспектов функционирования клеток, в том числе для тестирования потенциальных лекарственных препаратов [28]. Кроме того, реализация этого подхода для оценки цитотоксичности кларитромицина и метанола для срезов печени описана авторами в статье [29].

В данной работе предпринято исследование возможности использования подхода, основанного на применении кислородного электрода Кларка с иммобилизованными лимфоцитами человека, для оценки цитотоксичности потенциального противоопухолевого препарата 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на базе лаборатории неинфекционной иммунологии Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий (НОПЦ ГЛТ) ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

В качестве тестируемого цитотоксического соединения использовали потенциальный противоопухолевый агент 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин (2-ХММТ), синтезированный в Самарском государственном техническом университете (рис. 1). Его близкие аналоги известны как пролекарства, которые для проявления своей противоопухолевой активности должны пройти ряд метаболических превращений в организме, в результате которых образуются алкилирующие агенты [30]. Последние, вступая в реакцию с нуклеотидами и внедряясь в ДНК и РНК опухолевой клетки, блокируют ее деление и экспрессию генов, что считается основным, но не единственным цитотоксическим эффектом подобных соединений. Примером триазина, используемого для лечения злокачественных заболеваний, является алтретамин, который применяют в схемах лечения рака яичников. Согласно результатам QSAR-моделирования на веб-ресурсе PASS Online (<http://www.way2drug.com/passonline/index.php>), 2-ХММТ является потенциальным алкилирующим агентом, ингибитором лейкопоеза, взаимодействует с рядом цитокинов, выделяемых лейкоцитами, и обладает терапевтическим потенциалом при лечении глиомы, рака яичников и рака костей.



2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин (2-ХММТ)

Рис. 1. Структурная формула протестированного потенциального противоопухолевого агента.

С учетом этого, в качестве клеток-мишеней нами были выбраны лимфоциты (моноклеары периферической крови) условно здоровых добровольцев. Выбор данных клеток обусловлен доступностью биоматериала, простотой выделения, ведущей ролью в поддержании иммунного гомеостаза организма, особенно при проведении химиотерапии, а также достаточно высокой чувствительностью к действию цитотоксических препаратов.

Исследование выполняли на образцах цельной периферической венозной крови, которую забирали путем венепункции в вакутейнеры с EDTA K2. Все пробы периферической крови доставляли в лабораторию с соблюдением температурного режима и подвергали исследованию не позже 2 ч после взятия.

Лимфоциты, выделенные центрифугированием на градиенте плотности фикола $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ (ООО “БиолоГ”, Россия), непосредственно после выделения нанесли на хроматографическую стеклобумагу GF/A (Whatman, Великобритания) из расчета порядка 2–3 миллионов клеток на одно нанесение. Такое количество клеток занимало на носителе площадь порядка $3 \times 3 \text{ мм}$. Этот фрагмент стеклобумаги с клетками помещали в рабочую зону кислородного электрода Кларка ДКТП-02.4, подключенного к анализатору “Эксперт-001” (ООО “Эконикс-Эксперт”, Россия), и механически фиксировали с помощью капроновой сетки с плотностью 30 ячеек/см² и прижимного кольца. Электрод с клетками помещали в кювету, содержащую 2 мл рабочей среды (физиологический раствор с фосфатным буфером, pH 7.6) и размещенную на магнитной мешалке, и тщательно промывали, несколько раз меняя раствор, до установления стабильной концентрации растворенного кислорода в окружении клеток, после чего в кювету вносили субстрат и регистрировали изменение концентрации растворенного кислорода.

В качестве потенциальных индикаторных субстратов, ответ на которые можно было бы считать показателем метаболической активности лимфоцитов, использовали растворы глюкозы, глицина, лизина, орнитина, глицерофосфата натрия, цитрата натрия и тартрата натрия (ООО “АО РЕА-ХИМ”, Россия), конечная концентрация субстратов в кювете составляла 50 мМ. Целью данного этапа являлся поиск оптимального субстрата, вызывающего выраженную дыхательную активность клеток и заведомо не оказывающего токсического влияния. Выбор соединений основывался на их принадлежности к субстратам центрального метаболизма или близким производным, способным проходить через клеточные мембраны и опосредованно вовлекаемым в процесс окислительного фосфорилирования (как известно, сопровождающегося потреблением кислорода) через NAD-зависимые дегидрогеназы (глюкоза, глицерофосфат, цитрат, тартрат), либо к аминокислотам, которые участвуют во многих биохимических процессах в клетке и также могут использоваться в реакциях центрального метаболизма после дез- или трансаминирования.

Регистрацию и обработку сигналов осуществляли на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Эксперт-00х (ООО “Эконикс-Эксперт”) в течение ~5–10 мин, после чего электрод вместе с клетками промывали путем многократной смены рабочей среды до восстановления исходного равновесного уровня кислорода в кювете (~5–15 мин). Данный подход обеспечивал многократное использование клеток без их замены. В качестве измеряемой величины сигнала и условного показателя активности клеток в данной системе использовали максимальную скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата (мг O₂/л с), рассчитанную в программном обеспечении Эксперт-00х. В дальнейшем для этого параметра использовали термин “ответ” клеток на исследуемый субстрат. Каждое измерение в ходе экспериментов выполняли в трех повторах.

В экспериментах по оценке токсического воздействия 2-ХММТ вначале (т.е. до введения тестируемого соединения) регистрировали ответ лимфоцитов на глицерофосфат натрия, который принимали за 100% по отношению к ответам на данный субстрат, регистрируемым далее в ходе эксперимента после воздействия 2-ХММТ. После этого выполняли промывку кюветы рабочей средой до установления стабильной концентрации растворенного кислорода в окружении клеток, и по ее окончании в кювету добавляли раствор 2-ХММТ и измеряли потребление кислорода в течение 30 мин. Затем вновь выполняли промывку рабочей средой и повторно измеряли ответ на глицерофосфат натрия для оценки остаточной метаболической активности клеток. Такой

цикл, за исключением регистрации начального ответа на глицерофосфат, выполняли для каждой протестированной концентрации 2-ХММТ, причем учитываемыми параметрами являлись как непосредственный ответ клеток на токсический субстрат, так и их остаточная активность после его воздействия.

В качестве эталонного метода для оценки цитотоксичности 2-ХММТ использовали МТТ-тест, основанный на применении тетразолиевого красителя, свободно проникающего через мембраны клеток и преобразуемого ферментами митохондрий живых клеток в окрашенное соединение – формазан. В погибших клетках эти ферменты не действуют и такого преобразования не происходит, поэтому интенсивность полученного окрашивания прямо пропорциональна количеству живых (т.е. выживших после действия препарата) клеток в лунке [31].

Для проведения МТТ-теста выделенные на градиенте плотности фикола лимфоциты культивировали в стерильных условиях в полной питательной среде, содержащей или не содержащей различные концентрации 2-ХММТ. Полная питательная среда состояла из среды 199 с *L*-глутамином и 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (ООО “БиолоТ”, Россия). Лимфоциты инкубировали в полистироловых 96-луночных планшетах (АО “Фирма Медполимер”, Россия) из расчета 300 тысяч клеток на лунку при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч. Для оценки ингибиторного эффекта 2-ХММТ в лунки вносили водные растворы препарата в концентрациях 50, 10 и 5 мкМ.

По истечении 70 ч инкубирования планшет доставали из CO₂-инкубатора, переносили в ламинарный бокс и в каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ в концентрации (8 мг/мл), перемешивали покачиванием и дополнительно инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч. По истечении этого времени планшет центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, а затем с помощью автоматического лабораторного дозатора удаляли культуральную среду, не затрагивая осевшие клетки, после чего добавляли диметилсульфоксид в объеме 200 мкл для сольubilизации формазана.

Оптическую плотность во всех лунках планшета измеряли при длине волны 570 нм на многофункциональном планшетном ридере Tecan Infinity 200 Pro (Tecan Instruments, Австрия). По полученным данным рассчитывали процент жизнеспособности клеток в каждой лунке относительно контроля с построением графиков зависимости процента жизнеспособных клеток от концентрации 2-ХММТ с последующим определением пороговой токсической концентрации и концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀.

Пороговой токсической концентрацией считали концентрацию 2-ХММТ, обеспечивавшую минимальный (пороговый) токсический эффект, статистически значимо отличающийся от показателя, наблюдаемого для образца, не содержащего тестируемого соединения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием Microsoft Office Excel 2016 с надстройкой Attestat 12.5 (И.П. Гайдышев, Россия). Для оценки статистической значимости различия показателей использовали критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение кислородного электрода Кларка с нанесенными в область рабочей зоны лимфоцитами позволяло регистрировать потребление кислорода клетками в реальном времени. После промывки в окружении лимфоцитов устанавливалась постоянная концентрация кислорода, отличающаяся равновесие между фоновыми метаболическими процессами в клетках и поступлением кислорода в рабочую среду из атмосферы при перемешивании среды на мешалке. Это отображалось на графике регистрируемого сигнала в виде горизонтальной линии. После введения субстрата в кювету происходило его равномерное перемешивание, поглощение и утилизация клетками в ходе метаболических реакций. Это приводило к снижению концентрации кислорода в рабочей среде вследствие усиления окислительных процессов в клетках, сопровождающихся активизацией их дыхательной цепи. При введении токсических соединений, напротив, наблюдалось увеличение концентрации растворенного кислорода ввиду угнетения фонового окислительного метаболизма клеток, и такой ответ в дальнейшем называли “токсическим ответом” (рис. 2).

Скорость снижения концентрации кислорода была пропорциональна концентрации субстрата, однако отличалась для различных субстратов, вводимых в одинаковых концентрациях. На рис. 3 приведен набор ответов лимфоцитов на различные протестированные субстраты. Из данного графика видно, что интактные лимфоциты обладали наибольшей чувствительностью по отношению к органическим кислотам, в то время как их активность в отношении глюкозы и аминокислот была незначительной. Максимальная активность была продемонстрирована в отношении глицерофосфата натрия, ответ на который был принят при сравнении с остальными субстратами за 100%. Это соединение является одним из промежуточных продуктов липидного и углеводного обмена, предшественником пирувата и ацетил-КоА и, таким образом, вовлечено в широкий спектр метаболических реакций. Исходя из полу-

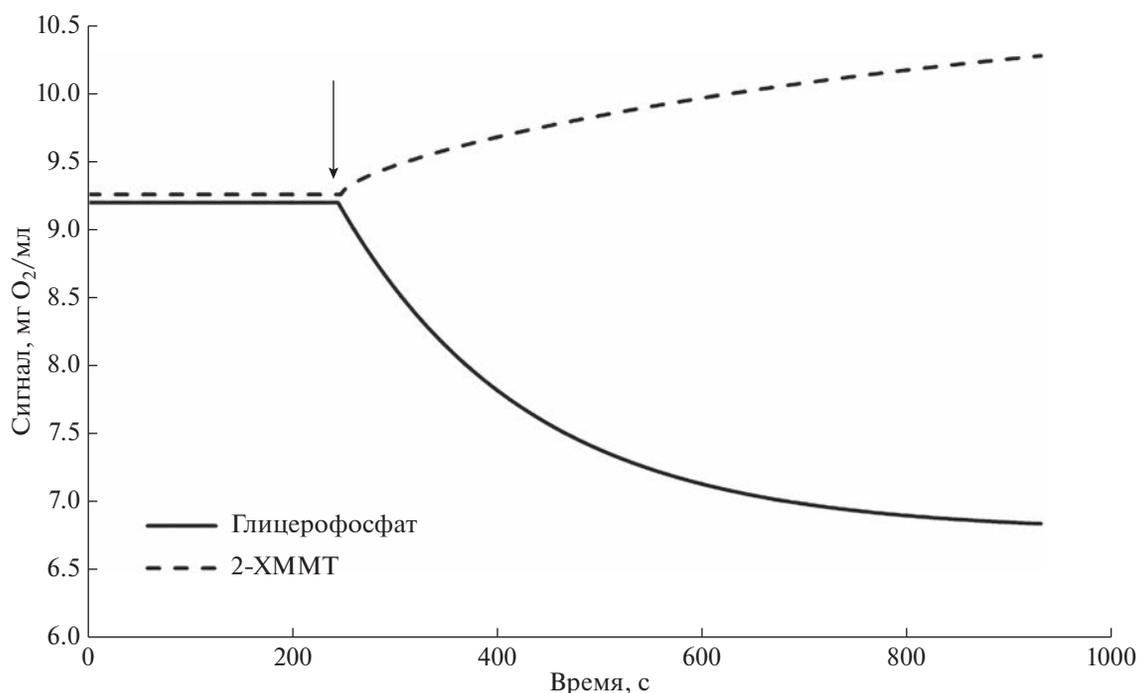


Рис. 2. Записи сигналов электрода с клетками при введении глицерофосфата и 2-ХММТ в кювету. Стрелкой отмечен момент ввода субстратов.

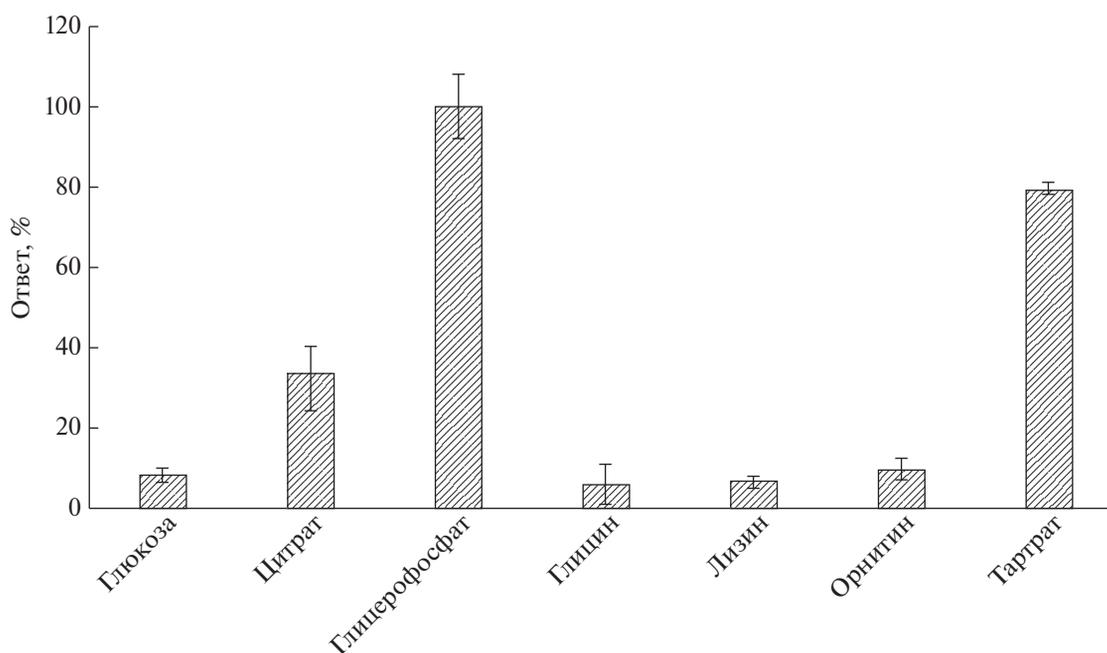


Рис. 3. Набор ответов лимфоцитов на 7 различных субстратов. Ответы клеток на субстраты приведены в процентах от ответа на глицерофосфат натрия, принятого за 100%. Концентрация всех субстратов составляла 50 мМ.

ченных данных, глицерофосфат натрия использовали в дальнейших экспериментах в качестве индикаторного субстрата для учета остаточной метаболической активности лимфоцитов, по-

скольку выраженный ответ клеток на него позволял рассчитывать на более высокую информативность оценки остаточной метаболической активности по сравнению с остальными субстратами в

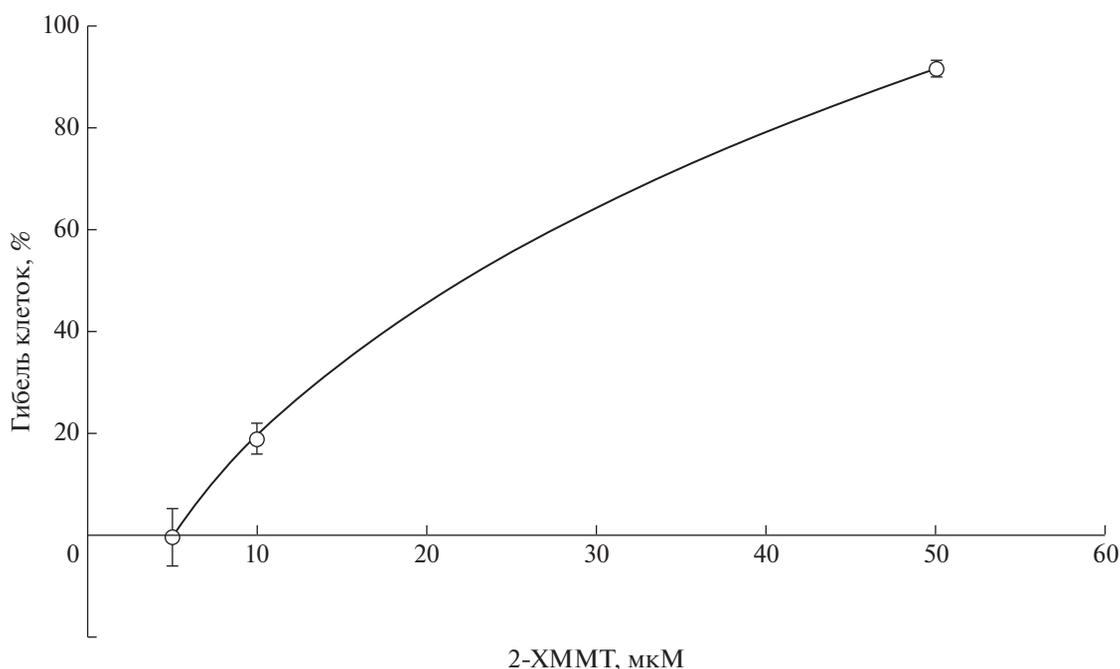


Рис. 4. Цитотоксическое действие 2-ХММТ на лимфоциты периферической крови согласно МТТ-тесту.

случае выраженного токсического действия тестируемого триазина на лимфоциты.

На рис. 4 приведены зависимости цитотоксического действия 2-ХММТ от его концентрации в ходе МТТ-теста. Продемонстрировано увеличение цитотоксического эффекта тестируемого соединения в зависимости от его концентрации, причем пороговая токсическая концентрация составила 8.1 ± 0.1 мкМ, а $IC_{50} - 22.1 \pm 2.0$ мкМ. Таким образом, 2-ХММТ оказывает выраженное цитотоксическое действие на лимфоциты, приводящее к их гибели.

На рис. 5 приведены измеренные с помощью электрода Кларка зависимости реакции лимфоцитов на 2-ХММТ от его концентрации: график величины непосредственного токсического ответа клеток на соединение (измеряемой в ходе регистрации сигнала в присутствии тестируемого триазина в кювете), показанный сплошной линией, и график величины остаточной активности клеток после действия соответствующей концентрации триазина, показанный пунктирной линией. За остаточную активность лимфоцитов, как указано выше, принимали величину ответа клеток на глицерофосфат натрия, вводимый после регистрации ответа на соответствующую концентрацию 2-ХММТ и промывки электрода с клетками, в процентах от ответа на глицерофосфат в начале эксперимента (до введения тестируемого соединения). Графики демонстрируют увеличение токсического ответа лимфоцитов, а также снижение остаточной активности в прямой зависимости от

концентрации 2-ХММТ, что указывало на подавление метаболической активности клеток, обусловленное токсическим действием этого соединения. С учетом данных МТТ-теста представляется возможным интерпретировать снижение остаточной активности как гибель клеток в результате цитотоксического эффекта.

На основании полученных зависимостей были определены пороговые концентрации триазина как в отношении непосредственной реакции клеток на воздействие соединений, так и в отношении остаточной активности клеток после такого воздействия. Под пороговой концентрацией, как и в случае МТТ-теста, подразумевали наименьшую концентрацию 2-ХММТ, при которой соответствующая реакция клеток (токсический ответ или остаточная активность) статистически значимо отличалась от исходной величины.

Минимальная концентрация 2-ХММТ, обеспечивавшая значимый токсический ответ лимфоцитов в данном методе, составила 4.0 ± 0.4 мкМ, а минимальная концентрация, после которой наблюдалось значимое снижение остаточной активности, — 22.9 ± 2.8 мкМ. Таким образом, использованный метод позволял регистрировать эффект концентраций тестируемого соединения, которые при кратковременном (менее 30 мин) воздействии еще не приводили к гибели клеток, вызывая лишь их метаболическую реакцию. Отметим, что пороговая концентрация, позволявшая регистрировать токсический ответ лимфоцитов с помощью электрода Кларка, была вдвое

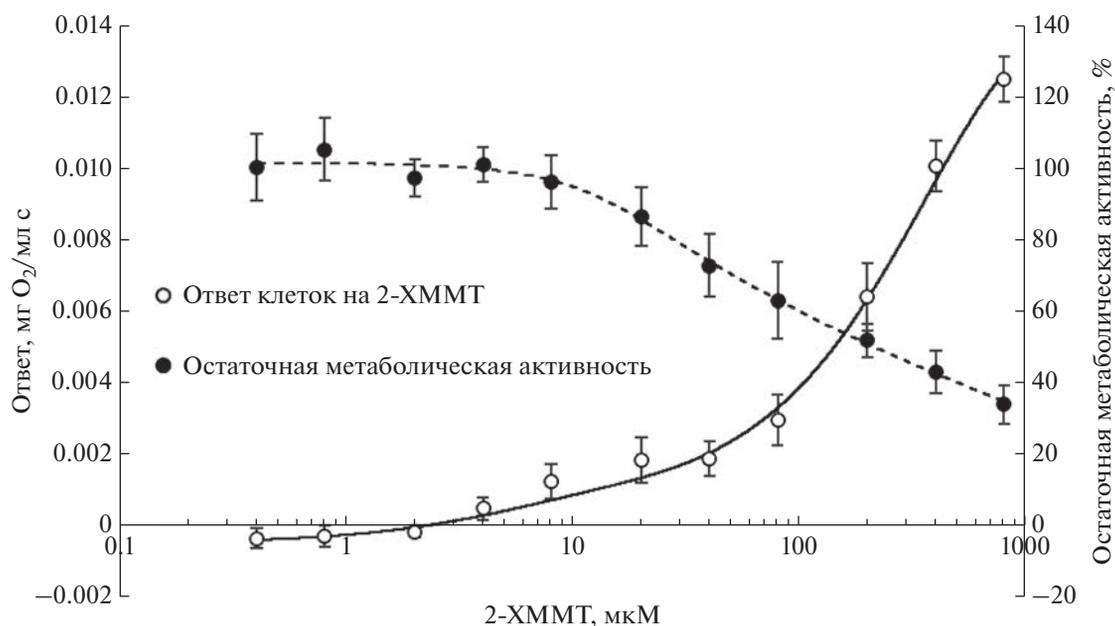


Рис. 5. Графики реакции лимфоцитов на 2-ХММТ в зависимости от его концентрации, регистрируемой с помощью электрода Кларка. Кривая, отображаемая белыми кружками и сплошной линией, относится к левой оси Y , кривая, отображаемая черными кружками и пунктирной линией, — к правой оси Y .

меньше минимальной токсической концентрации, полученной с помощью МТТ-теста. Таким образом, представленные результаты указывают на сопоставимость данных, полученных с помощью метода регистрации дыхательной активности лимфоцитов и классического метода оценки цитотоксичности — МТТ-теста. При этом отсутствие необходимости длительного культивирования и возможность многократного использования клеток делают данный метод более предпочтительным по сравнению с МТТ-тестом и другими традиционными методами анализа цитотоксичности. Дополнительным преимуществом метода является возможность оценки действия тестируемых соединений в реальном времени, в том числе эффектов, подавляющих физиологические процессы в клетках, но не приводящих к их гибели. Метод на основе регистрации дыхательной активности клеток, использованный в данной работе, способен обеспечить методически простую, ускоренную и точную оценку состояния клеток в различных условиях в реальном времени при их многократном использовании. Таким образом, оценка состояния клеток на основе электрохимической регистрации их дыхательной активности является перспективным направлением и может составить основу метода доклинической оценки безопасности потенциальных фармакологических агентов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов

интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках Государственного задания регистрационный № 122020100109-6 в Самарском государственном медицинском университете Минздрава России.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Сельменских Т.А., Макаренко И.Е. 2021. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований*. **2**, 16–24.
- Bartholomew E.F., Martini F.H., Nath J.L. 2018. *Fundamentals of anatomy and physiology*. Global edition. Harlow: Pearson Education Limited. 1306 p.
- Azevedo A.M., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosens. Bioelectronics*. **21** (2), 235–247.
- Bachmann T.T., Bilitewski U., Schmid R.D. 1998. A microbial sensor based on pseudomonas putida for phenol, benzoic acid and their monochlorinated derivatives which can be used in water and *n*-hexane. *Analyt. Lett.* **31** (14), 2361–2373.

5. Ziegler F.D., Strickland E.H., Anthony A. 1962. Oxidative phosphorylation and respiratory regulation in rat liver homogenates measured with the oxygen electrode. *Rep. US Army Med. Res. Lab.* 1–25.
6. Voss D.O., Cowles J.C., Bacila M. 1963. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Anal. Biochem.* **6**, 211–222.
7. Holtzman D., Moore C.L. 1971. A micro-method for the study of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **234** (1), 1–8.
8. Gaylor J.L., Miyake Y., Yamano T. 1975. Stoichiometry of 4-methyl sterol oxidase of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250** (18), 7159–7167.
9. Tedjo W., Chen T. 2020. An integrated biosensor system with a high-density microelectrode array for real-time electrochemical imaging. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **14** (1), 20–35.
10. Rajendran S.T., Huszno K., Debowski G., Sotres J., Ruzgas T., Boisen A., Zor K. 2021. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine. *Bioelectrochemistry.* **138**, 107720.
11. Cai Y., Wang M., Xiao X., Liang B., Fan S., Zheng Z., Cosnier S., Liu A. 2022. A membraneless starch/O₂ biofuel cell based on bacterial surface regulable displayed sequential enzymes of glucoamylase and glucose dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.* **207**, 114197.
12. Emelyanova E.V., Antipova T.V. 2022. Biosensor approach for electrochemical quantitative assessment and qualitative characterization of the effect of fusaric acid on a culture-receptor. *J. Biotechnol.* **357**, 1–8.
13. Hiramoto K., Yasumi M., Ushio H., Shunori A., Ino K., Shiku H., Matsue T. 2017. Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation. *Anal. Chem.* **89** (19), 10303–10310.
14. Rejmstad P., Johansson J.D., Haj-Hosseini N., Wardell K. 2017. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy. *J. Biophotonics.* **10** (3), 446–455.
15. Thews O., Vaupel P. 2015. Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia. *Strahlenther. Onkol.* **191** (11), 875–882.
16. Lau J.C., Linsenmeier R.A. 2012. Oxygen consumption and distribution in the long-evans rat retina. *Exp. Eye Res.* **102**, 50–58.
17. Sakr Y. 2010. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfus. Apher. Sci.* **43** (1), 79–94.
18. Godsman N., Kohlhaas M., Nickel A., Cheyne L., Mingarelli M., Schweiger L., Hepburn C., Munts C., Welch A., Delibegovic M., Van Bilsen M., Maack C., Dawson D.K. 2022. Metabolic alterations in a rat model of Takotsubo syndrome. *Cardiovasc. Res.* **118** (8), 1932–1946.
19. Pandya J.D., Sullivan P.G., Leung L.Y., Tortella F.C., Shear D.A., Deng-Bryant Y. 2016. Advanced and high-throughput method for mitochondrial bioenergetics evaluation in neurotrauma. *Methods Mol. Biol.* **1462**, 597–610.
20. Divakaruni A.S., Rogers G.W., Murphy A.N. 2014. Measuring mitochondrial function in permeabilized cells using the Seahorse XF analyzer or a Clark-type oxygen electrode. *Curr. Protoc. Toxicol.* **60**, 25.2.1–25.2.16.
21. Vial G., Guigas B. 2018. Assessing mitochondrial bioenergetics by respirometry in cells or isolated organelles. *Methods Mol. Biol.* **1732**, 273–287.
22. Silva A.M., Oliveira P.J. 2012. Evaluation of respiration with Clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol. Biol.* **810**, 7–24.
23. Mitchell R.J., Gu M.B. 2004. An Escherichia coli biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** (1), 46–52.
24. Mungroo N.A., Neethirajan S. 2014. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry—a review. *Biosensors (Basel).* **4** (4), 472–493.
25. Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А., Пономарева О.Н., Алферов В.А., Решетиллов А.Н., Щеглова В.А., Петрова С.Н. 2010. Применение биосенсора на основе иммобилизованных микроорганизмов для оценки токсичности продукции бытового назначения и товаров для детей. *Токсикол. вестник.* **1** (100), 34–40.
26. Polyak B., Marks R., Rode A., Rettberg P., Horneck G., Baumstark-Khan C. 2001. Comparison between two assay formats: Fiber optic Rec a lux sensor and SOS-lux assay in suspension and comparison between two reporter bacterial cells (*Escherichia coli* DPD1718 and *Salmonella typhimurium* TA1535). *BIOSET: Biosensors for Environmental Technology.* **8**, 13–18.
27. Ковтун С.В. 2009. Исследования выбросов от автотранспортных потоков методом биолюминесценции. *Горный информационно-аналитический бюллетень.* **S18**, 118–121.
28. Agilent Technologies Inc. How Agilent Seahorse XF analyzers work | Agilent. <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work> [Электронный ресурс] (дата обращения: 23.03.2023).
29. Ильясов П.В., Гусева О.С., Курицына А.П., Лимарева Л.В. 2023. Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ. *Гены и клетки.* (в печати).
30. Gidaspov A.A., Bakharev V.V., Kachanovskaya E.V., Kosareva E.A., Galkina M.V., Ekimova E.V., Yakunina N.G., Bulychev Y.N. 2004. Synthesis and cytotoxic activity of halogen-containing dinitromethyl-1,3,5-triazine derivatives. *Pharm. Chem. J.* **38** (8), 411–419.
31. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. 2005. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* Ред. Хабриев Р.У. Москва: Медицина, с. 637–674.

Assessment of the Toxic Effect of 2-(Chlorodinitromethyl)-4-Methoxy-6-(4-Methylpiperazine-1-yl)-1,3,5-Triazine by Respiratory Activity of Lymphocytes

P. V. Iliasov¹, L. V. Limareva¹, A. I. Sizova¹, *, V. A. Zalomlenkov², A. P. Kuricyna¹

¹Samara State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, 443099 Russia

²Samara State Technical University, Samara, 443100 Russia

*e-mail: a.i.sizova@samsmu.ru

A method for evaluation of metabolic characteristics of intact cells based on electrochemical registration of their respiratory activity was used to monitor a reaction of lymphocytes to a potential pharmacological agent, 2-(chlorodinitromethyl)-4-methoxy-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1,3,5-triazine. The method ensured an estimation of cytotoxicity of the test compound and made it possible to determine its minimum toxic concentrations for human lymphocytes. It was shown that the obtained results agree with the data of a reference method – MTT-based cell viability assay.

Keywords: cytotoxicity, respiratory activity, lymphocytes, antitumor agent, Clark-type electrode, triazines

УДК 577.3;577.175;576.08;543.426;612.014

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОВЕРХНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ: ПРИСУТВИЕ АЗУЛЕНОВ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ

© 2023 г. В. В. Рощина^а, *, В. А. Яшин^а, А. Р. Куньев^а

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

*e-mail: roshchinavic@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 21.05.2023 г.

Принята к публикации 24.05.2023 г.

Исследованы спектральные свойства поверхности растительных клеток различного эволюционного уровня от одноклеточных (диатомовых водорослей, спор хвоща и папоротника) до многоклеточных (древесных и травянистых видов) организмов. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки ряда анализируемых растений включали антиоксиданты – синие пигменты азулены. С помощью гистохимических методов обнаружено, что здесь также могут присутствовать нейротрансмиттерные соединения (биогенные амины), выделяемые в виде экскретов всей поверхностью или из специализированных секреторных структур листьев. В условиях высокой концентрации соли наблюдается выделение слизи, содержащей дофамин и гистамин, что блокируется добавлением экзогенного азулена и проазулена гроссегмина. Предполагается, что азулен поверхности защищает ее от образующихся активных форм кислорода и токсичных в высоких концентрациях биогеенных аминов.

Ключевые слова: азулены, биогеенные амины, поглощение, секреторные клетки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0233475523050079, **EDN:** TDZFS

ВВЕДЕНИЕ

Поверхность клеток растений чувствительна к изменениям концентрации тропосферного озона, засолению, травмирующим факторам и др. В качестве защиты выделяются разнообразные соединения в жидкой форме (фенолы, терпены, алкалоиды), а иногда и откладываются на поверхности. Выделение может происходить всей поверхностью или через специальные секреторные структуры [1]. Воспринимают внешние сигналы в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы, и они должны создавать защиту от проникновения токсичных веществ к плазмалемме и вглубь клетки. Общепринято, что антиоксидантной защитой растительных поверхностей обладают фенолы растительных экскретов и даже фенольные компоненты клеточной стенки. Недавно внимание было обращено на синие пигменты поверхности – азулены. С присутствием азуленов связан голубой цвет растений, который может принадлежать этим пигментам у некоторых травянистых и древесных видов [2].

Особое место в составе жидких секретов, выделяемых клеткой, могут занимать сигнальные соединения, известные как нейротрансмиттеры

животных – ацетилхолин и биогеенные амины: катехоламины, серотонин, гистамин (они есть у всех организмов и имеют также название биомедиаторы) [3]. Во многих случаях появление биогеенных аминов является реакцией на факторы окружающей среды. В выделениях одноклеточных спор хвоща появляются биогеенные амины под влиянием засоления [4] или озона [5]. В данный момент изучаются и экзогенные аллювиальные эффекты дофамина на растения, подвергшиеся абиотическому повреждению факторами, влияющими на физиологическое состояние целых растительных организмов [6, 7]. Также есть первые данные, связанные с выделением гистамина и дофамина харовыми водорослями [8]. Стоит отметить, что на клеточную оболочку могут попадать экзогенные нейротрансмиттеры, выделяемые животными, растениями и микроорганизмами [8, 9]. Химические взаимодействия между различными живыми организмами (растениями, животными, микробами) с помощью этих веществ могут играть важную роль в регуляции биоценоза, в том числе свидетельствуют о стрессе растительного организма, где участвуют биогеенные амины и ацетилхолин [10].

Используя спектральные методы анализа на модельных одноклеточных и многоклеточных системах организмов, в данной статье сделана попытка рассмотреть роль азуленов на поверхности растительной клетки во взаимодействии с сигнальными соединениями, такими как нейротрансмиттеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты. В качестве объектов исследований были выбраны одноклеточные и многоклеточные модели: виды, стоящих на разных ступенях эволюции. Первые представлены диатомовыми водорослями *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compere (Bacillariophyta, линия 2-903), культивируемыми в сосудах объемом 100 мл на питательной среде, которая включала в мкг/л: 6.63 K_2HPO_4 , 6.51 CaCl_2 , 3.47 NaCl , 5 MgCl_2 и 2 мкг/л силикагеля (Merck, Австрия) в качестве источника кремния [11]. Также анализировали одноклеточные вегетативные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense* L. (сем. Equisetaceae) и папоротника листовика (костенец) сколопендрового *Asplenium scolopendrium* L. (Newman) (сем. Aspleniaceae), культивируемые в лаборатории на предметных стеклах в чашках Петри на питательной среде, как описано ранее [12]. Вторая группа моделей включает образцы с голубой или серебристой поверхностью, собранные в 2020–2022 годах. Это были виды средней полосы России: как травянистые (райграсс пастбищный *Lolium perenne* L. и клевер белый *Trifolium repens* L.), так и древесные (кустарники облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. и ивы белой *Salix alba* L.), собранные в мае–июне на побережье реки Оки ботанического заказника г. Пущино. Также в качестве образцов использовали южные виды: хвою и шишкочагоды можжевельника высокого *Juniperus excelsa* Bieb. из Карадагского заповедника (Феодосия, Крым) и можжевельника среднего *Juniperus pfitzeriana* 'Blue Cloud' (*Juniperus x media* 'Blue Cloud') из семейства Cupressaceae из Национального парка-дендрария (г. Сочи), собранных в октябре и январе–феврале, листья эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. Ex. Benth (сем. Myrtaceae) с серебристой поверхностью и листья лавра благородного *Laurus nobilis* L. (сем. Lauraceae) из парка Южные культуры (г. Адлер), собранные в сентябре.

Спектральные методы. Поглощение, собственную флуоресценцию клеток до и после гистохимической обработки (см. гистохимический анализ) измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометра Unicam Helios-Epsilon (США), микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Россия) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции произ-

водили ультрафиолетовым светом с длиной волны 360–380 нм или лазером – 458 нм.

Положение максимумов в спектрах поглощения интактных поверхностей клеток, регистрируемых с помощью микроспектрофотометра МСФ-15, определяли согласно опции дифференцирования спектров отражения по Золотареву [13].

Фотографировали живые клетки до и после гистохимической обработки с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica Microsystems), конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 с камерой Levenhuk M300 Base (США). Изображение листьев в проходящем свете получали с помощью микроскопа In-vitro Evos M500 (Thermo Fisher Scientific, США). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95% этанолом из клеток (1 : 10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 ч и более) в 1–0.5 см кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Германия) и спектрофлуориметра Perkin Elmer 350 MPF-44B (Великобритания).

Определение азуленов. Азулены в экстрактах образцов 95% этанолом и ацетоном в течение 10–30 мин экспозиции определяли спектрофотометрически при 580 нм, как описано ранее [2]. Среднюю ошибку опыта из трех–четырёх повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля соответственно.

Гистохимический анализ на биогенные амины. Флуоресцентное гистохимическое определение биогенных аминов (дофамина, гистамина и серотонина) в клетках проводили согласно методам, первично описанным для клеток животных и применяемым также для растительных клеток [14, 15]. Микроспоры наносили на предметные стекла и смачивали каплями 0.5–1% растворов веществ: для определения дофамина глиоксиловой кислотой, гистамина – орто-фталевым альдегидом и серотонина – формальдегидом. Гистохимические реакции повторяли (до 3–5 раз). Автофлуоресценция и флуоресценция после гистохимического окрашивания биогенных аминов (см. спектральные методы) использовались в качестве тест-реакций клеток на предметных стеклах (слайдах). Все эксперименты проводились при комнатной температуре (20–22°C). После 10–20 мин окрашивания реагентом образцы сушили при 50–80°C в течение 5–10 мин. Флуоресцентные реакции формирующих продуктов изучали под микроскопом Leica DM6000B или камерой Levenhuk M300 при возбуждении светом длиной волны 360–380 нм. Спектры флуоресценции регистрировались микроспектрофлуориметром МСФ-15. Интенсивность флуоресценции

при 460 нм выражали статистически со стандартной ошибкой.

Электронный транспорт при фотосинтезе. Для анализа донорных свойств азулена проводили его испытание на электронный транспорт с NADP^+ [16], в модели изолированных хлоропластов *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (сем. Crassulaceae), не содержащих природных азуленов [17] в отличие от хлоропластов гороха и клевера, которые содержат эти пигменты [18]. Кроме того, небольшое количество хлорофилла позволяло наблюдать за синей окраской азулена в реакционной среде. В классических вариантах пластид гороха или шпината нециклический перенос электронов лучше наблюдался при возбуждении светом 650–660 нм, в то время как циклический транспорт при 700–719 нм. В нашей модели хлоропласты из каланхоэ показали фотохимическую активность с фильтрами 550–555 нм, а данные, полученные с интерференционными фильтрами 650 нм, 670 нм и 706 нм, были аналогичными, но с более низкими скоростями восстановления акцепторов [17]. Использовали 0.9 мкмоль/мл NADP^+ , 0.1 мг/мл ферредоксин из гороха, 10^{-6} М диурон или 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина, 10^{-5} М антимицин А. Актинический свет (интенсивность светового потока $38 \text{ к эрг см}^{-2} \text{ с}^{-1}$) проходил через интерференционный фильтр 550 нм. Количество NADPH выражено статистически со стандартной погрешностью. Взаимодействие азулена (2 мг/мл) с выделенными компонентами электрон-транспортной цепи (2 мг/мл) осуществляли на препаратах цитохрома C_{553} (цитохром f) из клеток водоросли *Chlorella*, пластоцианина, ферредоксина и ферредоксин-NADP-редуктазы из хлоропластов гороха [17].

Реагенты. В работе использовали азулен и глиоксилевую кислоту (Fluka, Австрия/Германия), орто-фталевый альдегид, формальдегид, дофамин, гистамин, серотонин (ICN Biomedical/Pharmaceuticals, США), NADP^+ (Sigma-Aldrich, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для рассмотрения роли поверхности клеток в модельных системах одноклеточных и многоклеточных организмов были применены спектральные и гистохимические методы.

Исследование поверхности разных типов клеток спектральными методами. Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала и может также быть защитным барьером, если включает соответствующие компоненты, защищающие клетку от любого повреждения. С помощью микроскопии в проходящем свете и люминесцентной микроскопии, включая микроспектрофлуориметрию/микроспектрофотометрию и лазер-сканирующую конфокальную микроско-

пию, мы исследовали различные модельные растительные клетки от низших организмов на эволюционной лестнице, одноклеточных: (диатомовая водоросль *Ulnaria ulna*, вегетативные одноклеточные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense* и папоротника костенца сколопендрового *Asplenium scolopendrium*) до высокоорганизованных многоклеточных покрытосеменных растений, получая их изображения (рис. 1) и спектры поглощения (рис. 2). На рис. 1 показан внешний вид поверхности растительных клеток у видов, стоящих на разных ступенях эволюции. С помощью микроскопии в проходящем свете и при возбуждении светом, вызывающим флуоресценцию объекта, в модельной системе одноклеточных почти бесцветных диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* мы смогли оценить состояние поверхности, лишь возбуждая флуоресценцию хлорофилла светом 430 нм (рис. 1а). Если красное свечение не наблюдается, то данная клетка мертва, и флуоресцируют зеленым светом твердые оболочки-панцири, пропитанные соединениями кремния [11]. У непроросшей вегетативной микроспоры хвоща *Equisetum arvense* в проходящем свете и при возбуждении светом 430 нм внешний слой твердой оболочки-эскины светится в голубой или синезеленой области и только у развивающейся клетки появляется красное свечение, а оболочка сбрасывается, когда начинается развитие клетки (рис. 1б). На более высокой ступени эволюции у папоротников в отличие от хвоща споры уже не имеют такой прочной оболочки, а заключены в спороносы с твердой оболочкой, что флуоресцирует зелено-желтым при возбуждении светом 430 нм, а споры внутри – зеленым (рис. 1в). Проросшая спора долго, до недели после смачивания спороносца, светится зеленым с максимумом 530 нм, пока в спектре флуоресценции не появится еще и максимум 680 нм, относящийся к уже синтезированному хлорофиллу.

Поверхность клетки диатомовых водорослей и споры хвощей – это плотный целлюлозный панцирь, включающий соединения кремния. У папоротника все споры заключены в спороносец, поверхность которого тоже представляет собой твердую оболочку, но такого панциря как у клеток диатомовых и спор хвоща у папоротника нет. У всех трех моделей неразвившихся клеток (диатомовых водорослей, хвоща и папоротника) светится зеленым поверхность клеток (максимум 520–530 нм). Хлорофилл синтезируется и обычно просвечивается красным светом изнутри клетки после начала развития. В отличие от листьев высших растений эвкалипта *Eucalyptus cinerea* и облипихи *Hippophae rhamnoides* сухие непроросшие споры хвоща и папоротника не имеют хлорофилла, что видно у них по отсутствию красной флуоресценции [12].

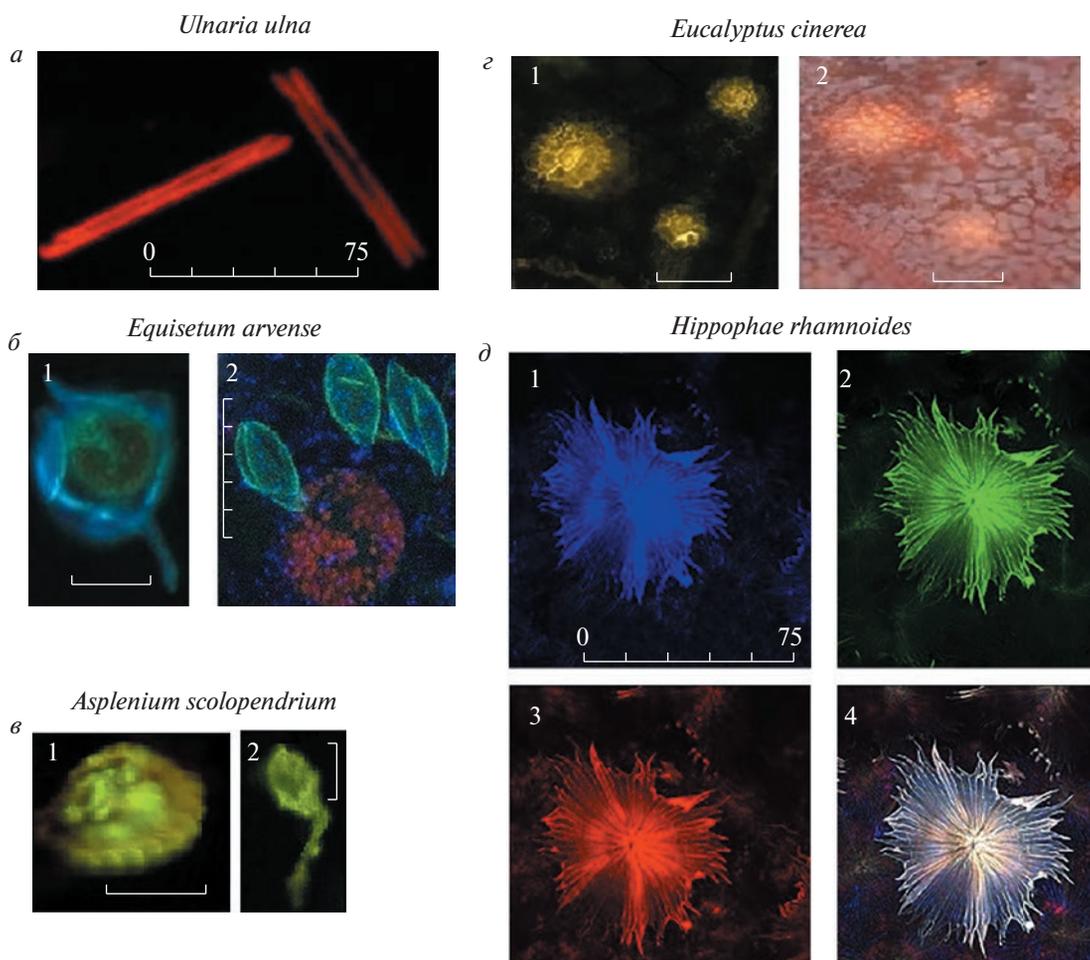


Рис 1. Изображения поверхности растительных объектов: флуоресцирующие при возбуждении светом 430 нм клетки диатомовой водоросли *Ulnaria ulna* (а) и вегетативные споры хвоща полевого *Equisetum arvense* (б), споронсец (1) и споры (2) папоротника *Asplenium scolopendrium* (в), листья *Eucalyptus cinerea* (г) в проходящем свете микроскопа Leica DM6000 В (где зеленовато-желтые масляные железы видны на темно-зеленой поверхности) и микроскопа Invitro Evos M5000 (где синие восковые пластины покрывают всю поверхность листа, включая желтые секреторные клетки желез). д – полученные с помощью конфокального микроскопа изображения возбуждаемой лазером 458 нм автофлуоресценции поверхностных желез облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides*: 1 – в синем (488–500 нм), 2 – зеленом (505–540 нм), 3 – красном (580–700 нм) каналах и 4 – наложение изображений из 3 каналов (сумма). Масштаб, мкм: 75, 25, 100 и 20, 100, 75 для а, б, в, г, д соответственно.

У многоклеточных моделей покрытосеменных растений (рис. 1г, 1д) нет таких плотных клеточных оболочек, но есть специальные секреторные структуры. У эвкалипта пепельного желто-зеленые секреторные железы хорошо видны в проходящем свете (рис. 1г, изображение 1 слева), и они флуоресцируют в зеленой области спектра [2, 15]. Более того, в проходящем свете на рис. 1г (изображение 2 справа) заметны голубоватые восковые пластины, покрывающие как эти железы, так и всю поверхность листа вне секреторных клеток. По-видимому, это пластины азуленов, ранее обнаруженных у этого вида в этанольных или ацетоновых 10 мин смывах листьев [2]. Лазер-сканирующая конфокальная микроскопия показала, что флуоресценция в сине-зеленом свете свойствен-

на и многоклеточным железам на поверхности листьев облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* (рис. 1д). Флуоресцентные методы дают возможность по автофлуоресценции показать строение клеточной поверхности, как мы видим, по эмиссии в голубой и сине-зеленой области спектра, и оценить жизнеспособность клеток, главным образом, по наличию хлорофилла внутри клеток.

Какие именно соединения находятся на поверхности клеток, и как это может быть связано с выделением секреторных продуктов, до сих пор мало изучено. В предыдущей работе, посвященной показателям устойчивости к озону, внимание привлекли древесные растения с голубой или серебристой окраской поверхности, где были обна-

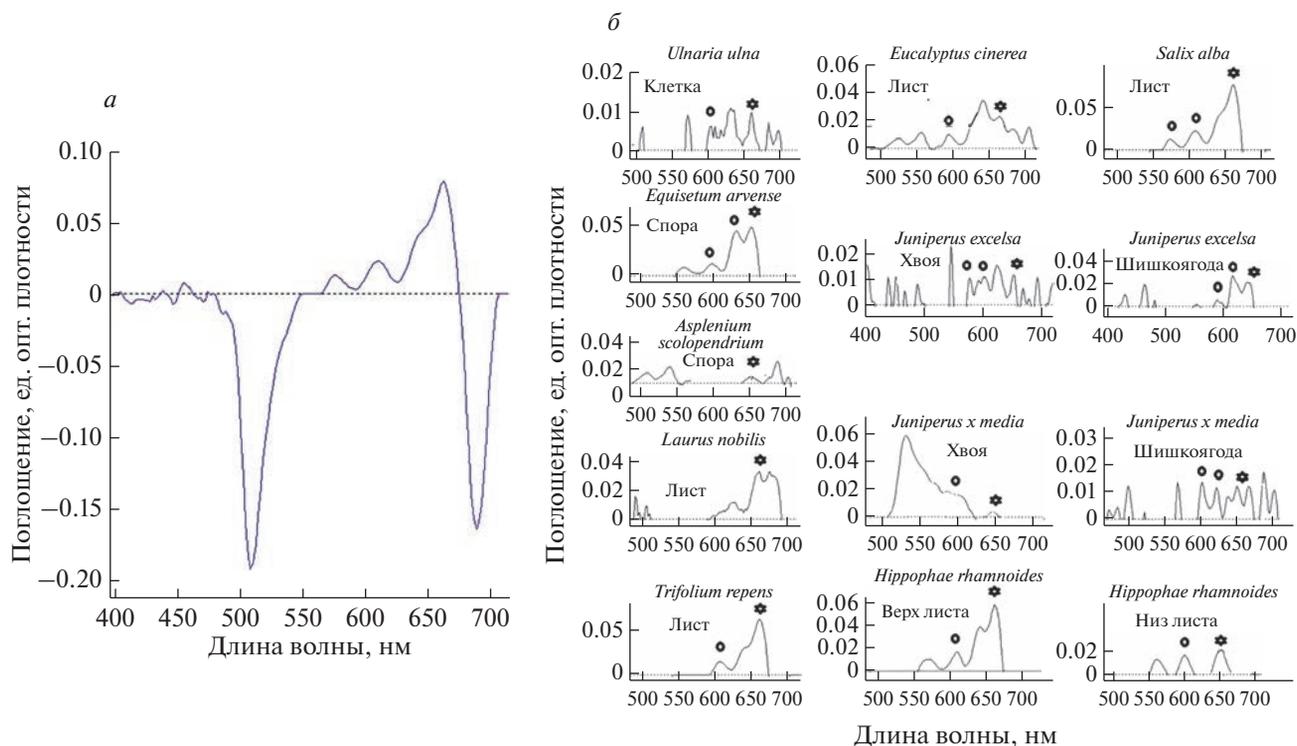


Рис. 2. Спектры поглощения поверхности различных растений (первая производная кривых для выявления максимумов). *a* – Исходный образец для листа *Salix alba*; *b* – верхние части графиков для использованных видов. Предполагаемые максимумы азуленов отмечены кружками, а максимум хлорофилла – звездочками.

ружены азулены [2]. Обычно для такого анализа требовалось много материала. Изображение поверхности листа эвкалипта в проходящем свете (рис. 1з) с помощью микроскопа Invitro Evos M5000 позволило увидеть азуленсодержащие восковые пластинки. Мы предположили, что максимумы их поглощения можно увидеть и в спектрах неповрежденных листьев. В данной работе для этой цели использовали микроспектрофотометр, чтобы получить данные по спектрам поглощения с поверхности объектов (рис. 2).

В спектре поглощения поверхности можно обнаружить максимумы, свойственные различным соединениям (400–460 нм – терпеноиды, 500–530 нм – фенолы, 570–620 нм – азулены и 660–666 нм – хлорофилл) [18]. Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофотометре/микроспектрофлуориметре имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения согласно работе [13]. Пример такого метода показан на рис. 2а для образца ивы белой *Salix alba*. Для выявления максимумов в области 550–670 нм достаточно было представить информацию с положительными значениями (верх графика), что сделано на рис. 2б для всех образцов.

Первая производная от спектра внешнего отражения для полос малой интенсивности позво-

лила непосредственно определить присутствие в спектрах после дифференцирования характерные для азуленов и хлорофилла максимумы: 580–620 и 660–666 нм соответственно (рис. 2). В спектрах поглощения бесцветных в проходящем свете диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* (рис. 2) наряду с максимумом хлорофилла, есть максимум 600–610 нм. У некоторых бурых водорослей азулены также найдены [19]. У синеватых вегетативных микроспор хвоща *Equisetum arvense*, содержащих азулены [18], отчетливо видны максимумы 610 нм и 612 нм, свойственные этим соединениям. Характерные для азуленов пики обнаружены в спектрах всех исследованных растений, кроме папоротника *Asplenium scolopendrium* и лавра *Laurus nobilis*. Принадлежность максимумов поглощения 580–630 нм мы далее подтвердили экспериментально с экстракцией азуленов в этаноле и ацетоне.

Азулены в экстрактах с поверхностями клеток. В табл. 1 приведены данные об азуленах изучаемых растений, вычисленных по интенсивности полос поглощения при 580 нм в 10 мин экстрактах – смывам с целой поверхности [2]. Прежде всего, присутствие азуленов в экстрактах подтвердило эксперименты по обнаружению характерных для синих пигментов максимумов в спектрах поглощения поверхностей клеток в области 580–610 нм (рис. 2). У спор папоротника *Asplenium* и листьев

Таблица 1. Содержание азуленов на поверхности листьев растений (10 мин экстракция этанолом)

Вид растения	Азулены, мг/г сырой массы
Хвощ полевой <i>Equisetum arvense</i> L., вегетативные споры	1.7 ± 0.02
Райграс пастбищный <i>Lolium perenne</i> L. (Graminae), листья	1.63 ± 0.07
Облепиха крушиновидная <i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Elaeagnaceae), листья	1.0 ± 0.06
Можжевельник высокий <i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb (Cupressaceae), хвоя	1.76 ± 0.03
Можжевельник средний <i>Juniperus pfitzeriana</i> (x <i>media</i>) 'Blue cloud' M. Bieb (Cupressaceae), хвоя	0.55 ± 0.01
Ива белая <i>Salix alba</i> L. (Salicaceae), листья	0.92 ± 0.04
Клевер белый <i>Trifolium repens</i> L. (Fabaceae), листья	0.41 ± 0.03

лавра *Laurus* такие максимумы в спектрах поглощения отсутствовали, не было и азуленов в их экстрактах. У придонной пресноводной диатомовой водоросли *Ulnaria ulna* подобные максимумы были, но в экстрактах органическими растворителями их сложно выделить. Принципиально важно, что у водорослей, в частности, бурых *Dicthyota dichotoma* [19] и придонных горгониевых обитателей Арктики [20], были найдены сесквитерпеновые лактоны азуленового ряда, обладающие способностью воздействовать на другие организмы. Они либо нарушали цепи питания насекомых, либо препятствовали развитию морских обитателей, которые вызывают обрастание днища судов.

При сравнении в табл. 1 оказалось, что у хвоща полевого, райграса, можжевельника высокого значения пигмента на мг сырой массы близки, тогда как у облепихи и можжевельника среднего за 10 мин экстрагируется значительно меньше азуленов. Вероятно, у последних видов пигмент присутствовал в более глубоких слоях кутикулы или даже клеточной стенки. Для всех исследованных видов характерна синяя или голубая окраска листьев. Из синеватых спор хвоща ранее был выделен один из азуленов, как и из хлоропластов клевера *Trifolium repens* [18]. Известно, что у некоторых можжевельников азулены находили в продуктах дистилляции эфирных масел [21]. Ранее присутствие азуленов показано в 10 мин спиртовых или ацетоновых экстрактах листовой поверхности у эвкалипта *Eucalyptus cinerea* и ряда хвойных растений с голубой поверхностью хвои, которые были устойчивы к озону [2]. Синие пигменты, как мы полагаем, служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием [22]. Именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у данных видов, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность к озону и активным формам кислорода. С присутствием азуленов связан голубой цвет поверхностей, который может принадлежать этим пигмен-

там у некоторых травянистых и древесных растений.

Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных [23, 24]. В модельных опытах на вегетативных микроспорах хвоща продемонстрированы антигистаминные свойства экзогенных азулена и проазуленовых сесквитерпенов [25].

Нейротрансмиттеры на поверхности клетки. На поверхность клетки могут выделяться эндогенные нейротрансмиттеры (можно рассматривать как физиологический ответ клетки на внешнее воздействие или внутриклеточную сигнализацию в направлении из клетки). Соединения, такие как дофамин и гистамин, могут быть у некоторых видов в норме, но часто появляются при стрессе. Они накапливаются под воздействием различных стрессовых факторов, как абиотических (ультрафиолетовое облучение, озон, засоление, засуха, дефицит питательных веществ и др.), так и биотических (повреждение насекомыми) в биоценозе [26, 27].

Биогенные амины были обнаружены нами гистохимическими методами по характерной флуоресценции при 460 нм в модельных системах организмов, непосредственно выделяющих их в природе: у одноклеточных диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* (Nitzsch) [11] и одноклеточных вегетативных микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* L. (сем. Equisetaceae) [14]. В табл. 2 сравнивается уровень трех биогенных аминов у указанной диатомовой водоросли и одноклеточной споры наземного растения папоротника *Asplenium scolopendrium*. У первого объекта в клетках преобладает дофамин, а меньше всего серотонина, тогда как у второго, судя по флуоресценции, оказалось больше гистамина, тогда как у споры отмечены близкие данные для дофамина и серотонина. В выделившемся секрете из споры серотонина значительно меньше, чем других изучаемых аминов.

Выделять биогенные амины могут и специализированные секреторные клетки поверхности (железы, волоски и др.), поскольку содержат ферменты, регулирующие их содержание, а также ан-

Таблица 2. Биогенные амины у диатомовых водорослей *Ulnaria ulna* L. и вегетативных спор папоротника листовика обыкновенного *Asplenium scolopendrium* L.

Вид растения	Флуоресценция при 460 нм, усл. ед.			
	контроль, автофлуоресценция	после гистохимических реакций на соединения		
		дофамин	гистамин	серотонин
<i>Ulnaria ulna</i>	10.3 ± 0.1	60.7 ± 0.2	34.0 ± 7.0	14.4 ± 0.2
<i>Asplenium scolopendrium</i> L.				
спора	15.5 ± 0.2	39.2 ± 0.9	102.8 ± 4.0	32.6 ± 2
секрет	0	57.4 ± 6.0	71 ± 5	14.0 ± 2

тинейротрансмиттеры, вещества, уменьшающие токсическое действие нейротрансмиттеров или блокирующие рецепторы. У покрытосеменных растений, как показано для желез эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea*, биогенные амины могут выделяться как всей поверхностью листьев (дофамин), так специализированными секреторными структурами (гистамин) поверхности [28]. На рис. 3 видно ярко-желтое свечение, характерное для высоких концентраций дофамина [29] в секреторных железах лекарственного растения облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* после гистохимической обработки глукосилевой кислотой. Причем дофамин присутствует во всех частях чешуйчатой структуры. Напротив, в реакции на гистамин синее свечение наблюдалось только в середине многоклеточной железы. Появление биогенных аминов часто связывают со стрессом, и возможно, что это не только маркер стресса, но и в какой-то мере защитная реакция.

Эффекты экзогенного азулена на выделение биогенных аминов из клеток и возможные механизмы. Учитывая, что листья исследуемых видов содержат азулены в поверхностном слое, как мы показали выше (табл. 1), вероятно взаимодействие между азуленами и выделяющимися биогенными аминами. Чтобы оценить такую возможность, были проведены модельные опыты на одноклеточных вегетативных микроспорах хвоща (рис. 4), которые выделяют значительные количества биогенных аминов при солевом стрессе с 1% сульфатом натрия, как в природных условиях [4]. В модельных опытах на вегетативных микроспорах хвоща были ранее продемонстрированы антигистаминные свойства экзогенных азулена и проазуленовых сесквитерпенов [25]. На рис. 4 показано, что в таких же условиях обнаружено влияние азулена и проазулена гроссгемина и на содержание дофамина в клетках и выделяющемся секрете. Наибольший эффект снижения дофамина отмечен для проазулена гроссгемина и азулена из пяти изученных сесквитерпенов как в клетках, так и в секрете (рис. 4) в условиях засоления среды 1% сульфатом натрия, стимулирующего выход био-

генных аминов наружу. Биогенные амины в больших количествах могут быть токсичными для клетки.

Учитывая, что азулен и дофамин могут благодаря двойным связям вступать в окислительно-восстановительные реакции, мы провели эксперименты с их этанольными растворами (табл. 3), моделируя возможность их взаимодействия на поверхности клеток. Дофамин в высоких концентрациях в присутствии кислорода через цепь реакций – супероксид-анион радикал → пероксид может превращаться в токсичный красный дофаминохром с максимумом поглощения 480 нм. В спектрах поглощения наблюдали, происходят ли изменения при 480 нм (возможное увеличение и появление красной окраски, свойственное дофаминохрому) и при 580 нм (максимум поглощения азулена). Последовательность добавления реагентов была следующей: “Дофамин + азулен” или “Азулен + дофамин” в соотношениях по весу исходного вещества 3 : 1. В первом случае отмечали только увеличение поглощения при 580 нм, а во втором варианте наблюдали увеличение оптической плотности при 480 нм (возможное образование небольшого количества дофаминохрома) и снижение ее при 580 нм. Однако видимого изменения общей синей окраски смеси не происходило за короткое (5 мин) время наблюдения. Только через 24 ч происходит изменение окраски в варианте “Дофамин + азулен”: почти вдвое увеличилось поглощение при 480 нм и резко снижалось при 580 нм, так что синяя окраска стала мало заметной, а была уже видна слабо розовая окраска. В варианте “Азулен + дофамин”, когда концентрация азулена больше в 3 раза дофаминохром через 24 ч не образовался вообще (нет поглощения при 480 нм), но и синяя окраска азулена, судя по поглощению при 580 нм, исчезла. В вариантах с гистамином и серотонином изменения отслеживали только при 580 нм: от 5 мин инкубации до 2 ч, но значимых изменений не было.

Следует рассмотреть также электрохимические возможности взаимодействия. Согласно работам Племенкова с соавт. [30], окислительно-восста-

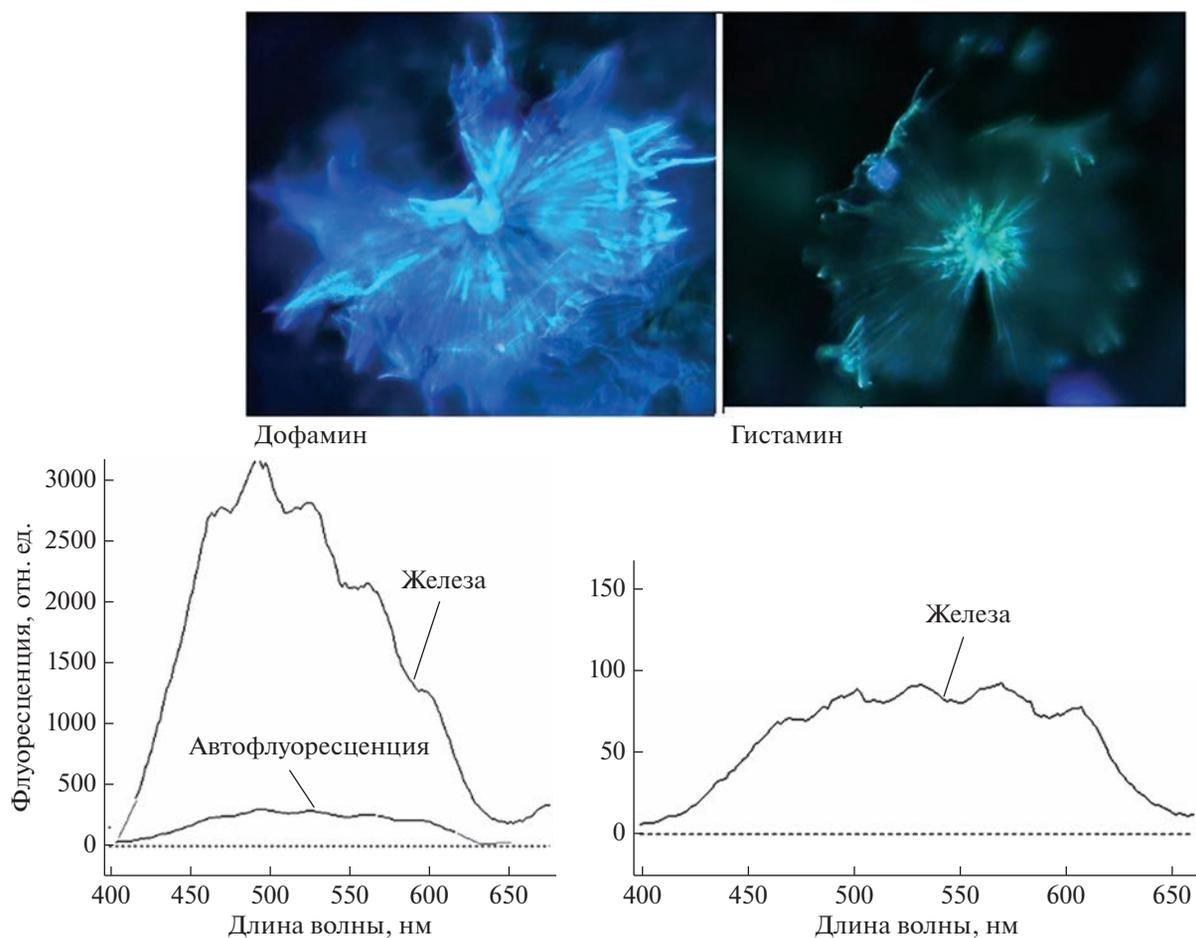


Рис. 3. Гистохимические реакции на дофамин и гистамин в секреторной чешуйке-железе листьев облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. Вверху – вид железы под люминесцентным микроскопом при возбуждении светом 360–380 нм. Внизу – спектры флуоресценции.

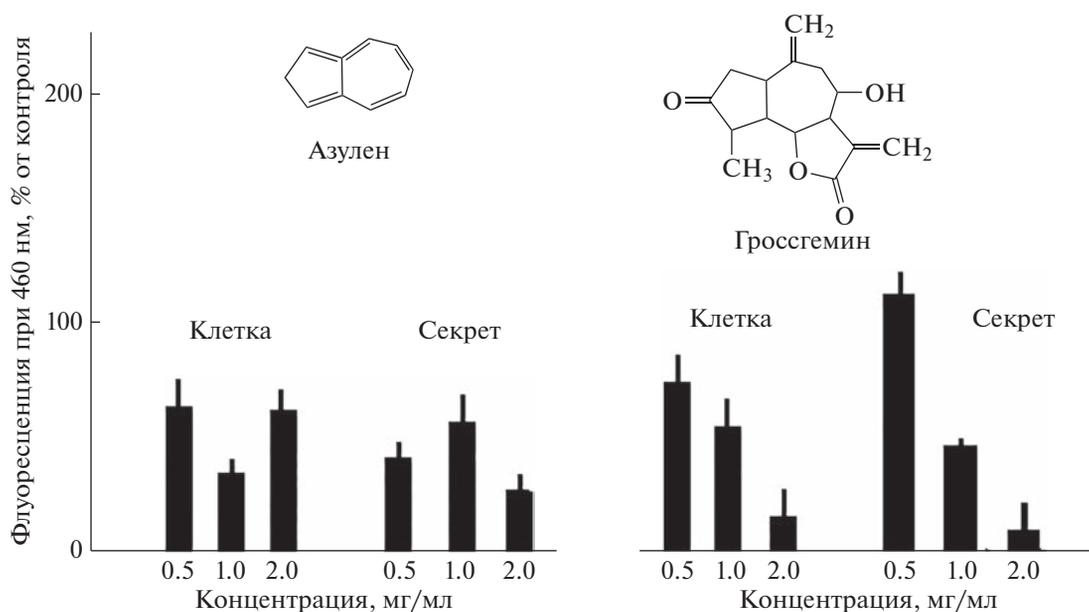


Рис. 4. Эффекты азулена и проазулена гроссгемина на содержание дофамина, оцениваемых по флуоресценции 460 нм после гистохимической обработки клеток вегетативных микроспор хвоща *Equisetum arvense* в условиях засоления 1% сульфатом натрия.

Таблица 3. Изменение интенсивности поглощения в исходных этанольных растворах азулена и дофамина. Кювета 0.2 см. Время после смешивания растворов 5 мин и 24 ч

Вещество	Спустя 5 мин		Спустя 24 ч	
	поглощение при длине волны		поглощение при длине волны	
	480 нм	580 нм	480 нм	580 нм
Дофамин (0.3 мг в 0.3 мл)	0.113	0.484	0.010	0.0
+ азулен (0.1 мг в 0.1 мл)	0.108	0.581	0.180	0.157
Азулен (0.3 мг в 0.3 мл)	0.120	0.961	0.0	1.27
+ дофамин (0.1 мг в 0.1 мл)	0.190	0.797	0.0	0.09

новительный потенциал азулена в ацетонитриле составляет +0.36 В. Пиковый ток соответствует переносу двух электронов на молекулу. В вольтаммограмме регистрируются два восстановительных пика при потенциалах +0.17 и +0.04 В. На изолированных хлоропластах гороха пара дофамин/аскорбат (дофамин в концентрациях, больших чем 10^{-5} М), способна восстанавливать окисленные цитохром f (редокс-потенциал +0.365 В) и пластоцианин (редокс-потенциал +0.37 В) [31] и быть донором электронов между цитохромом f и пластоцианином в электронтранспортной цепи. Синий азулен, если его добавили к раствору цитохрома f (цитохром C_{553}), выделенного из клеток хлореллы (соотношение реагентов по весу 1 : 1), становился бесцветным после потери электрона. Такая же, но более слабая реакция отмечена при взаимодействии с пластоцианином, изолированным из гороха. В смесях растворов азулена с индивидуальными ферредоксином, ферредоксин-NADP-редуктазой или NADP⁺ из-за их более отрицательных редокс-потенциалов, чем у синего пигмента, подобной реакции не происходило.

В модельных опытах на изолированных хлоропластах *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (fam. Crassulaceae), которые лишены природных азуленов, мы показали (табл. 4), что экзогенный азулен может являться донором электронов в электронтранспортной цепи фотосинтеза между цитохро-

Таблица 4. Эффекты азулена (конечная концентрация 0.01 мг в 0.5 мл образца) на фотосинтетический электронный транспорт в изолированных хлоропластах *Kalanchoe pinnata*. Актинический свет 550 нм

Вариант	Образование NADPH, мкг/мг хлорофилла ч
Контроль	1.34 ± 0.02
+ Азулен	5.64 ± 0.05
+ Диурон	0.11 ± 0.04
Диурон + Азулен	3.82 ± 0.02
Антимицин А	1.12 ± 0.03
Антимицин А + Азулен	3.20 ± 0.02

мом f (+0.36 В) и пластоцианином (+0.37 В), участвуя в нециклическом (ингибируется диурон) и циклическом (ингибируется антимицином А) транспорте электронов. В табл. 4 видно, что даже в случае блокады ингибитором диурон или антимицином А азулен способен восстанавливать электронный транспорт, быть, по-видимому, донором электронов.

Присутствие азуленов в хлоропластах гороха и клевера [16], по-видимому, неслучайно, и является также защитным механизмом в случае повреждения, где азулен донирует электроны в электрон-транспортную цепь. Учитывая, что этот материал требует специального рассмотрения в другой публикации, мы отметим главное в возможном механизме взаимодействия между азуленом и дофамином на поверхности растительных клеток, что азулены (и, вероятно, проазулены) как антиоксиданты могут предотвращать или замедлять образование токсичного дофаминахрома. Для гистамина и серотонина, вероятно, существует другой механизм взаимодействия с азуленом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение люминесцентной микроскопии с модификациями лазер-сканирующей конфокальной микроскопии и микроспектрофлуориметрии/микроспектрофотометрии позволило получить сведения о поверхности различных видов на эволюционной лестнице — от панцирей диатомовых водорослей и твердых покровов вегетативных микроспор хвоща до листьев покрытосеменных растений. У значительного числа растений с синей или серебристой поверхностью в спектрах поглощения обнаружены максимумы 580–620 нм, характерные для синих пигментов азуленов, что подтверждается их появлением в 10 мин экстрактах этанолом или ацетоном. У большинства исследованных видов из клеток наружу могут выделяться биогенные амины — дофамин, гистамин и серотонин, известные как нейротрансмиттеры животных. Выделение происходит как всей поверхностью, так и специализированными секреторными структурами. Вероятно, что азуленовый

слой (или слои) благодаря антиоксидантным свойствам служит определенным защитным фильтром от эндогенных и экзогенных биогенных аминов.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность и надежду на совместные исследования ботаникам, ведущим научным сотрудникам Сочинского дендрария и Карадагского заповедника в Крыму Г.А. Солтани и В.В. Фатерыге за предоставление образцов можжевельников и ценные консультации.

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

Источники финансирования. Работа выполнялась в рамках госпрограммы исследований 0116-2016-0004, раздел 61.3.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рощина В.Д., Рощина В.В. 1989. *Выделительная функция высших растений*. М.: Наука. 214 с.
2. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. 2022. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биол. мембраны*. **39** (1), 54–62.
3. Рощина В.В. 1991. *Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины*. Пушкино: Биологический центр РАН. 192 с.
4. Roshchina V.V., Yashin V.A. 2014. Neurotransmitters catecholamines and histamine in allelopathy: Plant cells as models in fluorescence microscopy. *Allelopathy J.* **34** (1), 1–16.
5. Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V. 2015. Fluorescent analysis for bioindication of ozone on unicellular models. *J. Fluorescence*. **25** (3), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1540-2>
6. Li C., Sun X., Chang C., Jia D., Wei Z., Li C., Ma F. 2015. Dopamine alleviates salt-induced stress in *Malus hupehensis*. *Physiol. Plantarum*. **153**, 584–602.
7. Liu Q., Gao T., Liu W., Liu Y., Zhao Y., Li W., Ding K., Ma F., Li C. 2020. Functions of dopamine in plants: A review. *Plant Signal. Behav.* **15** (12), 1827782. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1827782>
8. Roshchina, V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. 2019. Allelopathy experiments with Chara algae model. Histological analysis of the participation of neurotransmitter systems in water inhabitation. *Allelopathy J.* **46** (1), 17–24.
9. Oleskin A.V., Postnov A.L. 2022. Neurotransmitters as communicative agents in aquatic ecosystems. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* **77** (1), 6–12. <https://doi.org/10.3103/S0096392522010035>
10. Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C. 2021. Impact of biogenic amines on the growth of green microalgae. *J. Pharm. Nutr. Sci.* **1** (11), 144–150. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.17>
11. Roshchina V.V., Yashin V.A., Podunay Yu.A. 2022. Fluorescence in the study of diatom *Ulnaria ulna* cells. *Austin Environ. Sci.* **7**(3), 107–110.
12. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Яшин В.А., Карнаухов В.Н. 2002. Автофлуоресценция интактных спор хвоща *Equisetum arvense* L. в процессе их развития. *Биофизика* **7** (2), 318–324.
13. Золотарев В.М. 2012. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и спектроскопия*. **112** (1), 150–154.
14. Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V., Kulakov V.I. 2014. Fluorescent analysis of catecholamines and histamine in plant single cells. *Int. J. Biochem., Photon* **195**, 344–351.
15. Рощина В.В., Яшин В.А., Кучин А.В. 2016. Флуоресценция нейротрансмиттеров и их рецепция в растительной клетке. *Биол. Мембраны*. **33** (2), 105–112.
16. Акулова Е.А., Рощина В.В. 1977. Фотосинтетический электронный транспорт на уровне цитохрома f и пластоцианина. *Биохимия* **42** (12), 2140–2148.
17. Roshchina V.V. 2023. Plant leaf surface as a sensory system in allelopathic relations: Role of azulenes. *Allelopathy J.* **59** (2). <https://doi.org/10.26651/allele.j/2023-59-2>
18. Roshchina V.V. 2008. *Fluorescing World of Plant Secreting Cells*. Enfield, Jersey (USA), Plymouth: Science Publisher. 338 p.
19. Saleh M.A., Abdel-Moein N.M., Ibrahim N.A. 1984. Insect antifeeding azulene derivative from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *J. Agricultural Food Chem.* **32** (6), 1432–1434.
20. Cano L.P.P., Manfredi R.Q., Perez M., Garcia M., Blustein G., Cordeiro R., Perez C., Schejter L., Palermo J.A. 2018. Isolation and antifouling activity of azulene derivatives from the antarctic gorgonian *Acanthogorgia laxa*. *Chem. Biodivers.* **15**, e1700425.
21. Коновалов Д.А. 1995. Природные азулены. *Растительные ресурсы*. **31** (1), 101–130.
22. Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. 2022. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр. *Актуальные вопросы биол. физики и химии*. **7** (1), 36–39.
23. Bakun P., Czarzynska-Goslinska, B., Goslinski T., Lijewski S. 2021. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med. Chem. Res.* **30**, 834–846. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02701-0>
24. Murfin L.C., Lewis S.E. 2021. Azulene – a Bright core fore sensing and imaging. *Molecules*. **26** (2), 353–362. <https://doi.org/10.3390/molecules26020353>
25. Roshchina V.V., Konovalov D.A. 2022. Single cell plant model of *Equisetum arvense* for the study antihistamine effects of azulene and sesquiterpene lactones. *Future Pharm.* **2** (2), 126–134.
26. Gao T., Zhang Z., Liu X., Wu Q., Chen Q., Liu Q., van Nocker S., Ma F., Li C. 2020. Physiological and transcriptome analyses of the effects of exogenous dopamine on drought tolerance in apple. *Plant Physiol. Biochem.* **148**, 260–272.
27. Jiao C., Lan G., Sun, Y., Wang G., Sun Y. 2021. Dopamine alleviates chilling stress in watermelon seedlings

- via modulation of proline content, antioxidant enzyme activity, and polyamine metabolism. *J. Plant Growth Regul.* **40** (1), 277–292.
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10096-2>
28. Roshchina V.V. 2022. Biogenic amines in plant cell at norma and stress: Probes for dopamine and histamine. In: *Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture. Roles in Stress Tolerance*. Eds Amsterdam: Elsevier Naeem M. and Tariq Aftab.p. 357–376.
29. Жимова Н.С., Любовцева Л.А., Гурьянова Е.А., Мулендиев С.В. 2007. Люминесцентно гистохимическое исследование гистамина в структурах кожи после обработки гиалуроновой кислотой. *Вестник Оренбургского гос. университета.* **6**, 109–117.
30. Племенков В.В., Янилкин В.В., Палей Р.В., Нго Бакопки Б., Морозов В.Н., Максимиук Н.Н. 2001. Реакции одноэлектронного окисления и восстановления сульфидов азуленового ряда. *Журн. орг. химии.* **71** (3), 494–500.
31. Roshchina V.V. 1990. Biomediators in chloroplasts of higher plants. 3. Effect of dopamine on photochemical activity. *Photosynthetica.* **24** (1), 117–121.

Spectral Characteristics of the Plant Cell Surface: Occurrence of Azulenes and Biogenic Amines

V. V. Roshchina¹, *, V. A. Yashin¹, A. R. Kunyev¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: roshchinavic@mail.ru

Spectral properties of the surface of plant cells at various evolutionary levels from unicellular (diatoms, horsetail, and fern spores) to multicellular (woody and herbaceous species) organisms have been studied. It was shown that the surface layers of the cuticle and cell wall of a number of analyzed plants included antioxidants – blue pigments azulenes. Using histochemical methods, it was found that neurotransmitter compounds – biogenic amines – are present as excretions on the entire surface or specialized secretory structures of leaves. Under conditions of high salt concentration, dopamine and histamine are secreted, which is blocked by the addition of exogenous azulene and proazulene grosshemine. It is assumed that the azulene-containing surface protects cells from the formed reactive oxygen species and biogenic amines that are toxic at high concentrations.

Keywords: absorbance, azulene, biogenic amines, cell wall, fluorescence, secretory cells

УДК 612.741.91

АНАЛИЗ РОЛИ КАНАЛОВ Piezo1 В МЕХАНОАНАБОЛИЧЕСКОМ СОПРЯЖЕНИИ В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ

© 2023 г. К. В. Сергеева^а, С. А. Тыганов^а, В. Е. Калашников^а,
Б. С. Шенкман^а, Т. М. Мирзоев^{а, *}

^аГосударственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

*e-mail: tmirzoev@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Известно, что активация синтеза белка и гипертрофия мышечных волокон в ответ на механическую нагрузку реализуется через анаболический mTORC1-зависимый сигнальный путь. Однако до сих пор не выявлены механосенсоры, посредством которых механический сигнал может восприниматься и далее передаваться на mTORC1-зависимый сигнальный путь (механотрансдукция). Механоактивируемые (МА) ионные каналы являются претендентами на роль таких сарколеммальных механосенсоров. В связи с этим цель работы состояла в исследовании потенциальной роли МА каналов (Piezo1) в активации mTORC1-зависимого пути в изолированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы в ответ на механическую нагрузку. Крысы Wistar были разделены на 3 группы: 1) “Контроль” (мышцы животных не подвергались действию ингибитора МА каналов или активатора каналов Piezo1), 2) “Гадолиний” (мышцы животных инкубировались с ингибитором МА каналов – хлоридом гадолиния), 3) “Yoda” (мышцы животных инкубировались с активатором МА каналов Piezo1 – Yoda1). У крыс из каждой группы *m. soleus* из левой конечности инкубировалась в соответствующем растворе без механической нагрузки в виде серии растяжений (resting), а *m. soleus* из правой конечности подвергалась серии растяжений (stretch), а затем инкубировалась в соответствующем растворе. Фосфорилирование мишеней mTORC1 (p70S6K, rpS6, 4E-BP1) в *m. soleus* крысы определяли с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. Серия растяжений/укорочений изолированной *m. soleus* привела к увеличению фосфорилирования p70S6K, ее субстрата rpS6, а также 4E-BP1 на 38.5, 168 и 112% соответственно по сравнению с мышцей, которая не подвергалась механическому воздействию. Инкубация мышц с гадолинием полностью предотвратила вызванную серией растяжений активацию маркеров mTORC1. Инкубация *m. soleus* в растворе с Yoda1 привела к снижению механоиндуцированного фосфорилирования p70S6K, rpS6 и 4E-BP1 по сравнению с мышцей, которая не подвергалась действию Yoda1. Таким образом, использовавшийся в настоящей работе методический подход не выявил участия Piezo1 в механоанаболическом сопряжении в *m. soleus* крысы.

Ключевые слова: скелетная мышца, механотрансдукция, пассивное растяжение, Piezo1, гадолиний, Yoda1, mTORC1, p70S6K, rpS6, 4E-BP1

DOI: 10.31857/S0233475523050080, **EDN:** NXXYPK

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание мышечной массы, имеющее важное значение для здоровья человека и качества его жизни [1], главным образом зависит от динамического баланса синтеза и распада мышечных белков (протеостаз) [2, 3]. Хорошо известно, что механическое напряжение скелетных мышц, наблюдаемое, например, при выполнении резистивных тренировок, увеличивает скорость синтеза мышечных белков и при регулярных тренировках приводит к увеличению количества миофибриллярных белков и гипертрофии мышечных волокон [4]. При этом важно отметить, мышечная ра-

бота/механическая нагрузка *per se* способна смещать протеостаз в сторону синтеза белка и вызывать гипертрофию мышц вне зависимости от действия гормонов (гормон роста, инсулин) и наличия в крови питательных веществ (эксперименты с голодающими животными) [5]. Следовательно, волокна скелетных мышц млекопитающих обладают специальными механосенсорными структурами, которые воспринимают механическое напряжение и преобразуют его в биохимические каскады, регулирующие белковый синтез (анаболическая механотрансдукция). Исследования показывают, что ключевая роль в активации

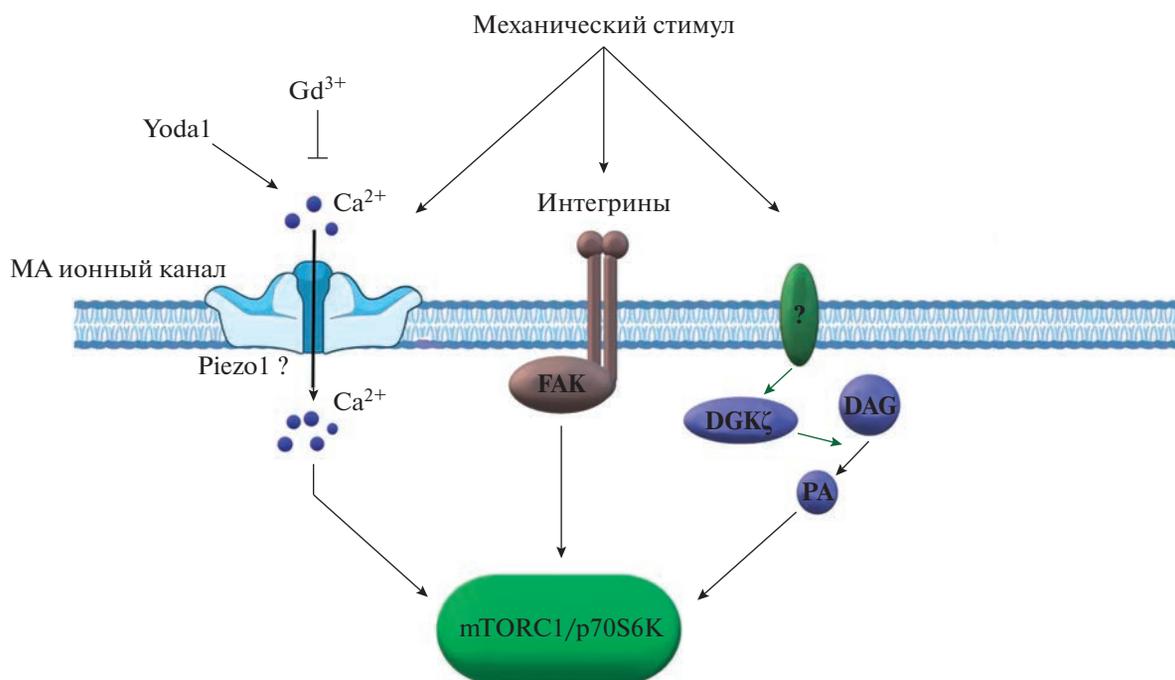


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая возможные механизмы механоанаболического сопряжения в скелетной мышце млекопитающих. В настоящее время роль каналов Piezo1 в механоанаболическом сопряжении в скелетной мышце не установлена. Обозначения: МА – механоактивируемый, FAK – киназа фокальных контактов, DAG – диацилглицерин, DGK ζ – диацилглицеролкиназа (изоформа дзета), PA – фосфатидная кислота, mTORC1 – мишень рапамицина у млекопитающих (комплекс 1), p70S6K – киназа p70 рибосомального белка S6.

синтеза белка в скелетной мышце в ответ на механические стимулы принадлежит белковому комплексу mTORC1 (мишени рапамицина у млекопитающих, комплекс 1) [6–8]. Об активности mTORC1 судят по фосфорилированию его ключевых субстратов – p70S6K (рибосомальная киназа p70) и 4E-BP1 (белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E) [9]. В свою очередь, активность p70S6K определяется путем оценки фосфорилирования рибосомального белка S6 (rpS6) [9]. Комплекс mTORC1 считается ключевым звеном в передаче механического сигнала к процессам, связанным с синтезом мышечных белков, что подтверждается серией элегантных экспериментов, показавших, что активация mTORC1 прежде всего зависит от механических воздействий и не зависит от влияния системных ростовых факторов [10, 11]. На сегодняшний день идентифицировано несколько различных механосенсорных структур/механизмов, обеспечивающих механочувствительность мышечных волокон (рис. 1). Тем не менее, консенсуса в рамках научного сообщества относительно полного понимания молекулярного механизма передачи механического сигнала в мышечных клетках (волокнах) до сих пор не достигнуто. Предыдущие исследования показали, что механическое напряжение может стимулировать синтез мышечного белка посредством еще не идентифицированных механосенсорных структур, действующих на дзета-изофор-

му диацилглицеролкиназы (DGK ζ), что приводит к превращению диацилглицерина (DAG) в фосфатидную кислоту (PA), которая непосредственно активирует mTORC1 [12] (рис. 1). Существуют также данные о том, что в активации анаболического сигналинга в мышечных волокнах в ответ на механическую нагрузку может принимать участие связанная с белками интегринами киназа фокальных контактов (FAK) [13] (рис. 1). При этом, вероятно, решающую роль в быстрой передаче механических сигналов в живых клетках играют механоактивируемые ионные каналы. Работая в миллисекундном масштабе времени, они находятся в самом начале сигнальных путей, участвующих в процессе механотрансдукции. Наше внимание привлекли каналы Piezo1, поскольку ранее было показано, что механоактивируемые каналы (stretch-activated channels) с неустановленной молекулярной природой могут участвовать в передаче механических стимулов к mTORC1-зависимому анаболическому сигнальному пути [14]. Одним из наиболее вероятных претендентов на роль таких механоактивируемых (МА) ионных каналов является недавно идентифицированный в скелетной мышце мембранный белок Piezo1 [15] (рис. 1). В связи с этим, цель работы состояла в исследовании потенциальной роли МА каналов (Piezo1) в активации mTORC1-зависимого пути в изолированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) крысы в ответ на механическую нагрузку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Организация эксперимента. В исследовании использовались самцы крыс Wistar массой 190 ± 10 г. Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Крысы были разделены на 3 группы (по 7 животных в каждой группе): 1) группа без добавления ингибитора или активатора механоактивируемых каналов в раствор с изолированной мышцей (“Контроль”), 2) группа животных с добавлением хлорида гадолиния (ингибитор механоактивируемых каналов) в раствор с изолированной мышцей (“Гадолиний”) и 3) группа с добавлением активатора каналов Piezo1 в раствор с изолированной мышцей (“Yoda”). В качестве активатора каналов Piezo1 использовался препарат Yoda1 (CAS 448947-81-7, Tocris Bioscience, Великобритания) с конечной концентрации в растворе 10 мкМ. Конечная концентрация хлорида гадолиния (sc-224004, Santa Cruz Biotechnology, США) в растворе также составляла 10 мкМ. Под изофлурановым наркозом у животных извлекались левая и правая камбаловидные мышцы. В каждой группе мышца из левой конечности оставалась в растворе Рингера–Кребса в состоянии покоя (resting), а мышца из правой конечности подвергалась механической нагрузке в виде цикла пассивных растяжений (stretch) согласно протоколу, изложенному в работе [16]. Yoda1 и хлорид гадолиния добавлялись в растворы с обеими мышцами соответствующей группы. Программа эксперимента и все манипуляции с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 632 от 18.01.2023 г.).

Механическая нагрузка изолированной мышцы в виде цикла пассивных растяжений. Перед экстирпацией *m. soleus* измерялась оптимальная длина данной мышцы *in situ* с помощью цифрового штангенциркуля, располагая коленный и голеностопный суставы под прямым углом. Далее мышцу извлекали из животного и помещали в охлажденный раствор Рингера–Кребса (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ NaH_2PO_4 , 2 мМ CaCl_2 , 2 мМ MgCl_2 , 24 мМ NaHCO_3 , 11 мМ глюкозы) с постоянной перфузией карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) и инкубировали в течение 30 мин. После чего на одной из мышц завязывали двойной простой узел вокруг дистального и проксимального концов мышцы вблизи мышечно-сухожильного соединения для прикрепления мышцы к датчику силы с одного конца и к фиксированному крючку с другого конца в ванночке с регулируемой температурой (28°C) (Aurora Scientific Bath 809C, Канада). Оптимальную длину мышцы (L_0) заново определяли с помощью серии одиночных сокращений (0.5 мс, 10 В). Вторая мышца при этом все время находилась в тех же условиях, но не прикреплялась к

устройству растяжения и все время теста находилась в покое. Мышцу растягивали в автоматическом режиме в течении 300 мс на 5 мм от L_0 , эта длина мышцы удерживалась 1 с после чего возвращалась к L_0 . Между повторами растяжения был задан перерыв в 10 с. После 6 таких повторов вводился дополнительный перерыв в 300 с. После 300 с весь цикл повторялся еще 9 раз, длительность всего теста составляла 55 мин. После всего этого цикла обе мышцы помещались на 1 ч в раствор Рингера–Кребса. Это время необходимо для активации mTORC1-зависимого сигнального пути в изолированных мышцах крыс в ответ на серию пассивных растяжений [16]. После этого обе мышцы (покоящаяся и подвергавшаяся растяжениям) быстро высушивались на фильтровальной бумаге и замораживались в жидком азоте для последующего анализа.

Гель-электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг. Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz Biotechnology), 10 мкг/мл апротинин (Sigma, США), 10 мкг/мл лейпептин (Sigma), 10 мкг/мл пепстатин (Sigma), 20 мкл Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Швейцария), 40 мкл фосфоингибиторный коктейль (Santa Cruz Biotechnology).

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4% Ds-Na, 20% глицерин, 10% β -меркаптоэтанол, 0.02% бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10% разделяющем ПААГ. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories, США) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). Для контроля ровной загрузки белка мембрана окрашивалась красителем Ponceau S. После электропереноса мембраны инкубировали в растворе 5% сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубация мембран с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. В работе использовались следующие первичные антитела: p-p70S6K (Thr 389) с разведением 1 : 1000 (sc-11759, Santa-Cruz Biotechnology), p70S6K (#9202, 1 : 3000, Cell Signaling, США), p-4E-BP1 (Thr37/46) с разведением 1 : 1000 (#2855, Cell Signaling), 4E-BP-1 (1 : 1000, #9452,

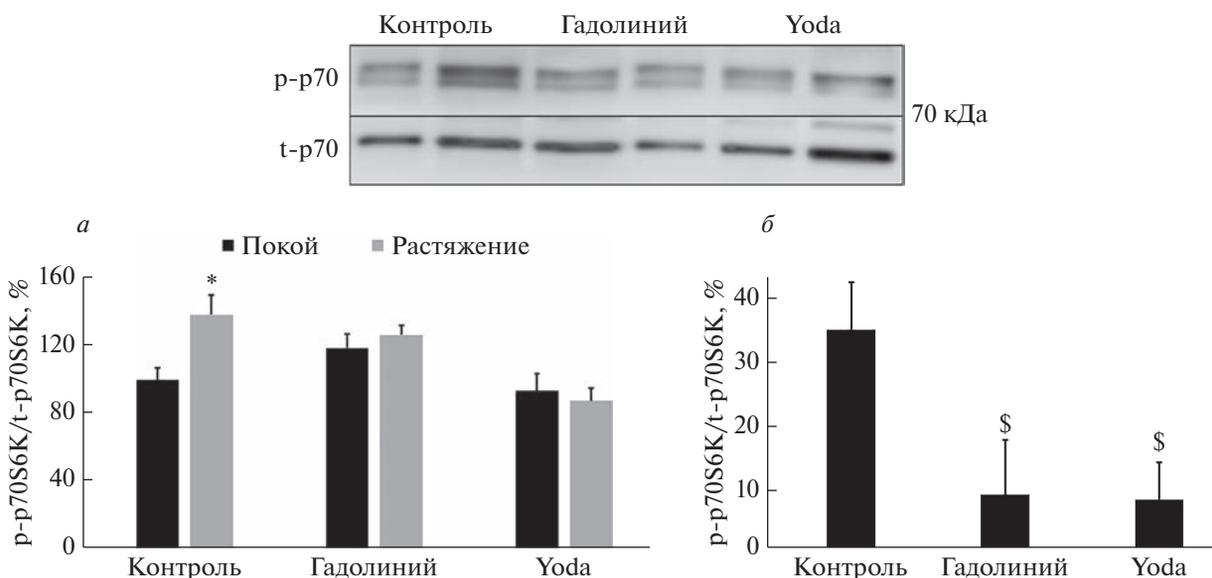


Рис. 2. Фосфорилирование p70S6K (Thr 389) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. “Контроль” – камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” – камбаловидные мышцы инкубировали с гадолинием; “Yoda” – камбаловидные мышцы инкубировали с Yoda1. * – статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ – статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$).

Cell Signaling), p-rpS6 (Ser 240/244) с разведением 1 : 2000 (#2215, Cell Signaling), rpS6 (#2217, 1 : 3000, Cell Signaling), Anti-GAPDH (#2118, Cell Signaling) в разведении 1 : 10000. В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1 : 50000. Выявление белковых полос осуществляли с помощью набора Clarity Max ECL Western Blotting Substrates (BioRad Laboratories). Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, США). Статистическая обработка полученных изображений проводилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0 (LI-COR Biosciences).

Статистический анализ. Для определения различий между покоящейся мышцей и мышцей, которая подвергалась механической нагрузке (из одного животного) применялся парный *t*-тест. Для установления различий между группами применялся дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (Tukey post-hoc test). Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через час после окончания серии пассивных растяжений в изолированной *m. soleus* крысы наблюдалось достоверное увеличение фосфорилирования киназы p70S6 и ее субстрата рибосомаль-

ного белка S6 (rpS6), а также 4E-BP1 на 38.5%, 168% и 112% соответственно по сравнению с интактной мышцей, которая не подвергалась механическому воздействию (рис. 2а, 3а, 4а). Полученные данные хорошо согласуются с ранее опубликованными работами, в которых исследовалось влияние цикла пассивных растяжений или эксцентрических сокращений скелетных мышц на активацию mTORC1-зависимого сигнального пути. Так, Rindom et al. (2019) показали, что через час после цикла пассивных растяжений изолированной *m. extensor digitorum longus* произошло достоверное увеличение фосфорилирования mTOR (Ser 2448) и rpS6 (Ser235/236) [16]. Активация mTORC1-зависимой сигнализации наблюдалась также через час после окончания серии эксцентрических сокращений изолированных *m. extensor digitorum longus* у мышей [17] и *m. soleus* у крыс [18]. Примечательно, что активация mTORC1 (судя по уровню фосфорилирования его мишеней) в ответ на серию пассивных растяжений, проводившихся в настоящем исследовании, оказалась сопоставима с уровнем активации mTORC1 в *m. vastus lateralis* человека (молодых мужчин) после выполнения произвольных максимальных эксцентрических упражнений [19, 20], несмотря на более гетерогенный состав мышечных волокон в *m. vastus lateralis* по сравнению с *m. soleus*.

Как видно на рис. 2, 3, 4, инкубация изолированных мышц в растворе с хлоридом гадолиния (группа “Гадолиний”) полностью предотвратила

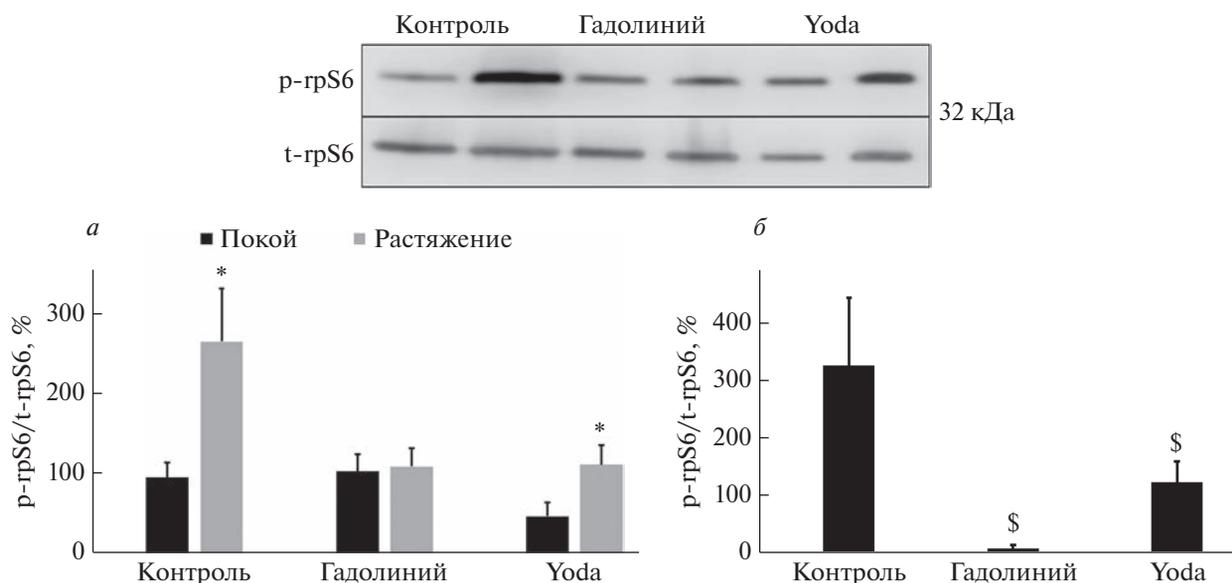


Рис. 3. Фосфорилирование грS6 (Ser 240/244) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. “Контроль” – камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” – камбаловидные мышцы инкубировались с гадолинием; “Yoda1” – камбаловидные мышцы инкубировались с Yoda1. * – статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ – статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$).

вызванную серией растяжений активацию (активирующее фосфорилирование) маркеров mTORC1-зависимого сигнального пути. Такого рода снижение фосфорилирования мишеней mTORC1 в скелетных мышцах крысы в ответ на механические воздействия (серия эксцентрических сокращений) ранее было отмечено после воздействия гадолиния, стрептомицина [14], а также в камбаловидной мышце после функциональной разгрузки [18]. Действительно, исследуя влияние функциональной разгрузки *m. soleus* у крыс на процесс передачи механического сигнала к анаболическим сигнальным путям, был обнаружен интересный феномен: уже после 24 ч функциональной разгрузки задних конечностей анаболический ответ *m. soleus* (интенсивность синтеза белка и уровень фосфорилирования p70S6K) на эксцентрическую нагрузку был значительно ниже, чем у мышцы контрольного животного [18]. При этом обработка солью гадолиния *m. soleus*, изолированной у животного, подвергнутого функциональной разгрузке, не приводило к углублению эффекта снижения анаболического ответа на эксцентрическую нагрузку [18]. Эти результаты могли быть связаны с тем, что механизмы, затронутые действием функциональной разгрузки, сходны с механизмами, измененными под действием гадолиния, и, по-видимому, обусловлены нарушением работы МА ионных каналов. Более того, применение гадолиния способствовало предотвращению активации mTORC1-сигналинга и синтеза

белка в *m. soleus* крысы в период острой 12-часовой реадaptации (которая “воспринимается” атрофированной *m. soleus* как эксцентрическая нагрузка) после функциональной разгрузки [21]. Однако в описанных выше экспериментах не была выявлена молекулярная природа МА каналов. Использование гадолиния, к сожалению, не позволяет установить, какие именно каналные белки могли выступать в роли механосенсора. Более того, гадолиний является относительно неспецифичным ингибитором, поскольку способен блокировать также кальциевые каналы L-типа и депо-управляемые кальциевые каналы, хотя и с меньшей эффективностью [22]. Однако в 2010 году в мышечных клетках нейробластомы [23] и несколько лет назад в мышечных клетках [15, 24] и волокнах [15] были обнаружены трансмембранные белки Piezo1, являющиеся основным компонентом МА ионного канала. Более того, в 2015 году был открыт селективный агонист каналов Piezo1 под названием Yoda1 [25]. В настоящем исследовании инкубация интактных (не подвергавшихся растяжениям) камбаловидных мышц в растворе с Yoda1 в течение 1.5 ч не привела к каким-либо значимым изменениям фосфорилирования mTORC1-зависимых субстратов (рис. 2, 3, 4). Однако инкубация *m. soleus* в растворе со специфическим активатором каналов Piezo1 во время серии пассивных растяжений привела к достоверному снижению механозависимого фосфорилирования p70S6K (рис. 2), грS6 (рис. 3) и 4E-BP1

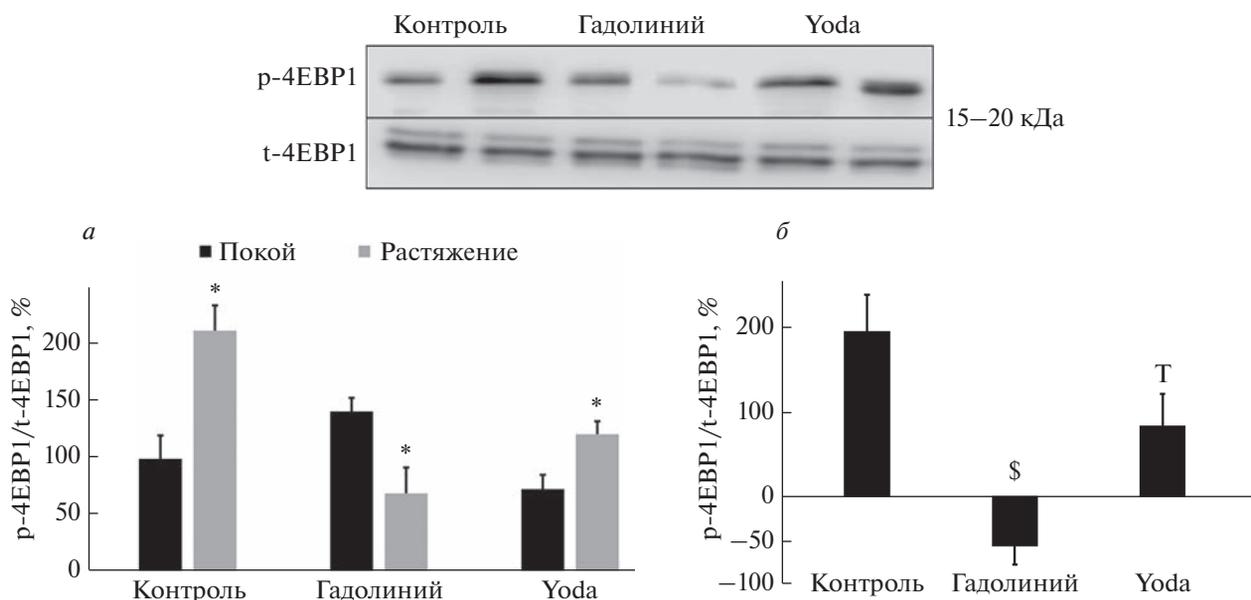


Рис. 4. Фосфорилирование 4EBP1 (Thr 37/46) после нахождения изолированной *m. soleus* мышцы в покое (“Покой”), а также через час после серии пассивных растяжений (“Растяжение”) (а). Разница в степени фосфорилирования между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе (б). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. “Контроль” – камбаловидные мышцы не подвергались инкубации с гадолинием или Yoda1; “Гадолиний” – камбаловидные мышцы инкубировались с гадолинием; “Yoda” – камбаловидные мышцы инкубировались с Yoda1. * – статистически значимые отличия между покоящейся и растягиваемой мышцей в каждой группе ($p < 0.05$); \$ – статистически значимые отличия от группы “Контроль” ($p < 0.05$). T – тенденция к отличию от группы “Контроль” ($p < 0.1$).

(рис. 4) по сравнению с контрольной мышцей (т.е. без инкубации с активатором каналов Piezo1). Установить точные причины наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным, однако можно предположить, что между различными механосенсорными элементами (например, механоактивируемыми каналами TRPC (канонические каналы TRP), Piezo1 и FAK (киназа фокальных контактов) мышечного волокна могут устанавливаться “конкурентные” отношения. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что применение ингибитора FAK предотвращало снижение анаболического ответа (активность mTORC1) в атрофированной *m. soleus* после серии эксцентрических сокращений [26]. Принимая во внимание, что передача сигнала от FAK к анаболическим сигнальным путям может быть связана с активацией актиновых стресс-фибрилл, которые могут влиять на активность МА каналов [27, 28], ответы сигнальных мишеней этих механосенсорных структур могут быть реципрокны. То есть может иметь место взаимозависимость между разными механосенсорными элементами, при которой активация одного механосенсорного элемента подавляет активность другого механосенсорного элемента и наоборот. Мы также предполагаем, что инкубация *m. soleus* в растворе с Yoda1 во время серии пассивных растяжений могла привести к снижению фосфорилирования p70S6K вслед-

ствие активации некоего “предохранительного” механизма, направленного на предотвращение гиперактивации анаболического сигналинга. Кроме того, нельзя исключать возможности того, что непосредственное механическое растяжение и химическая активация (с помощью Yoda1) участвуют в открытии МА канала Piezo1 путем разных механизмов. В связи с этим, влияние Yoda1 не исчерпывает всех эффектов Piezo1. Высказанные выше предположения, несомненно, требуют дальнейших исследований.

Таким образом, инкубация изолированных камбаловидных мышц крысы в растворе с ингибитором механоактивируемых каналов (гадолинием) и активатором канала Piezo1 (Yoda1) после серии механических воздействий в виде мышечных растяжений привела к снижению механозависимой активации mTORC1-зависимого сигнального пути. При применяемом в настоящем исследовании виде механического воздействия, каналы Piezo1, по-видимому, не участвуют в проведении механического сигнала к сигнальному пути mTORC1/p70S6K в изолированной *m. soleus* крысы.

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

Источники финансирования. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-10046).

Соответствие принципам биоэтики. Все эксперименты, описанные в настоящей статье, были проведены с соблюдением всех биоэтических норм и одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 632 от 18.01.2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Srikanthan P., Karlamangla A.S. 2014. Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults. *Am. J. Med.* **127** (6), 547–553.
2. Phillips B.E., Hill D.S., Atherton P.J. 2012. Regulation of muscle protein synthesis in humans. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **15** (1), 58–63.
3. Atherton P.J., Greenhaff P.L., Phillips S.M., Bodine S.C., Adams C.M., Lang C.H. 2016. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: Clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **311** (3), E594–E604.
4. Damas F., Phillips S., Vechin F.C., Ugrinowitsch C. 2015. A review of resistance training-induced changes in skeletal muscle protein synthesis and their contribution to hypertrophy. *Sports Med.* **45** (6), 801–807.
5. Goldberg A.L., Etlinger J.D., Goldspink D.F., Jablecki C. 1975. Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports.* **7** (3), 185–198.
6. Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3** (11), 1014–1019.
7. Drummond M.J., Fry C.S., Glynn E.L., Dreyer H.C., Dhanani S., Timmerman K.L., Volpi E., Rasmussen B.B. 2009. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *J. Physiol.* **587** (Pt 7), 1535–1546.
8. Goodman C.A., Frey J.W., Mabrey D.M., Jacobs B.L., Lincoln H.C., You J.S., Hornberger T.A. 2011. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J. Physiol.* **589** (Pt 22), 5485–5501.
9. Goodman C.A. 2019. Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J. Appl. Physiol.* (1985). **127** (2), 581–590.
10. Hornberger T.A., Stuppard R., Conley K.E., Fedele M.J., Fiorotto M.L., Chin E.R., Esser K.A. 2004. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem. J.* **380** (Pt 3), 795–804.
11. Hornberger T.A., Chu W.K., Mak Y.W., Hsiung J.W., Huang S.A., Chien S. 2006. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** (12), 4741–4746.
12. You J.S., Lincoln H.C., Kim C.R., Frey J.W., Goodman C.A., Zhong X.P., Hornberger T.A. 2014. The role of diacylglycerol kinase zeta and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **289** (3), 1551–1563.
13. Graham Z.A., Gallagher P.M., Cardozo C.P. 2015. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **36** (4–5), 305–315.
14. Spangenburg E.E., McBride T.A. 2006. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. *J. Appl. Physiol.* (1985). **100** (1), 129–135.
15. Bosutti A., Giniatullin A., Odnoshivkina Y., Giudice L., Malm T., Sciancalepore M., Giniatullin R., D'Andrea P., Lorenzon P., Bernareggi A. 2021. “Time window” effect of Yoda1-evoked Piezo1 channel activity during mouse skeletal muscle differentiation. *Acta. Physiol. (Oxf).* **233** (4), e13702.
16. Rindom E., Kristensen A.M., Overgaard K., Vissing K., de Paoli F.V. 2019. Activation of mTORC1 signalling in rat skeletal muscle is independent of the EC-coupling sequence but dependent on tension per se in a dose-response relationship. *Acta. Physiol. (Oxf).* **227** (3), e13336.
17. O’Neil T.K., Duffy L.R., Frey J.W., Hornberger T.A. 2009. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J. Physiol.* **587** (Pt 14), 3691–3701.
18. Tyganov S., Mirzoev T., Shenkman B. 2019. An anabolic signaling response of rat soleus muscle to eccentric contractions following hindlimb unloading: A potential role of stretch-activated ion channels. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (5), 1165.
19. Gehlert S., Suhr F., Gutsche K., Willkomm L., Kern J., Jacko D., Knicker A., Schiffer T., Wackerhage H., Bloch W. 2015. High force development augments skeletal muscle signalling in resistance exercise modes equalized for time under tension. *Pflügers Arch.* **467** (6), 1343–1356.
20. Rahbek S.K., Farup J., Moller A.B., Vendelbo M.H., Holm L., Jessen N., Vissing K. 2014. Effects of divergent resistance exercise contraction mode and dietary supplementation type on anabolic signalling, muscle protein synthesis and muscle hypertrophy. *Amino Acids.* **46** (10), 2377–2392.
21. Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S. 2019. Acute recovery from disuse atrophy: The role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **316** (1), E86–E95.
22. Yeung E.W., Allen D.G. 2004. Stretch-activated channels in stretch-induced muscle damage: Role in muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31** (8), 551–556.
23. Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T.J., Ranade S., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* **330** (6000), 55–60.
24. Tsuchiya M., Hara Y., Okuda M., Itoh K., Nishioka R., Shiomi A., Nagao K., Mori M., Mori Y., Ikenouchi J.,

- Suzuki R., Tanaka M., Ohwada T., Aoki J., Kanagawa M., Toda T., Nagata Y., Matsuda R., Takayama Y., Tomimaga M., Umeda M. 2018. Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nat. Commun.* **9** (1), 2049.
25. Syeda R., Xu J., Dubin A.E., Coste B., Mathur J., Huynh T., Matzen J., Lao J., Tully D.C., Engels I.H., Petrassi H.M., Schumacher A.M., Montal M., Bandell M., Patapoutian A. 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife.* **4**, e07369.
26. Tyganov S.A., Mirzoev T.M., Rozhkov S.V., Shenkman B.S. 2019. Role of the focal adhesion kinase in the anabolic response to the mechanical stimulus in rat's atrophied postural muscle. *Aviakosm. Ekolog. Med.* **53** (4), 74–79.
27. Sbrana F., Sassoli C., Meacci E., Nosi D., Squecco R., Paternostro F., Tiribilli B., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L. 2008. Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295** (1), C160–C172.
28. Martino F., Perestrelo A.R., Vinarsky V., Pagliari S., Forte G. 2018. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* **9**, 824.

Analysis of the Role of Piezo1 Channels in Mechano-Anabolic Coupling in Rat Soleus Muscle

K. V. Sergeeva¹, S. A. Tyganov¹, V. E. Kalashnikov¹, B. S. Shenkman¹, T. M. Mirzoev¹, *

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

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

It is known that mTORC1-dependent pathway is involved in the activation of muscle protein synthesis and hypertrophy in response to mechanical stress. However, mechanosensors that mediate sensing and transmission of mechanical signals to the mTORC1 signaling pathway (mechanotransduction) are not yet identified. Mechanically activated (MA) ion channels are viewed as potential candidates for the role of such sarcolemmal mechanosensors. The aim of our work was to investigate the potential role of MA channels (Piezo1) in the activation of the mTORC1 pathway in the isolated rat soleus muscle in response to mechanical stress. Wistar rats were divided into 3 groups: 1) "Control" (isolated muscles were not exposed to MA channel inhibitor or Piezo1 channel activator); 2) "Gadolinium" (muscles were incubated with MA channel inhibitor, gadolinium chloride); 3) "Yoda" (muscles were incubated with Yoda1, Piezo1 activator). In rats from each group, the soleus from the left limb was incubated in the appropriate solution without mechanical stress in the form of a passive stretching, and the soleus from the right limb was subjected to passive stretching and then incubated in the appropriate solution. Phosphorylation of mTORC1 targets (p70S6K, rpS6, 4E-BP1) in rat soleus was determined by PAGE and immunoblotting. After passive stretching of the isolated soleus muscle there was an increase in phosphorylation of p70S6K, its substrate, rpS6, as well as 4E-BP1, by 38.5%, 168%, and 112%, respectively, compared to the soleus muscle that was not subjected to stretching. Incubation of the muscles with gadolinium completely prevented the activation of mTORC1 markers caused by stretching. Incubation of the soleus muscle in the solution with Yoda1 resulted in a decrease in the mechano-dependent phosphorylation of p70S6K, rpS6, and 4E-BP1 compared to a muscle that was not exposed to Yoda1. Thus, Piezo1 channels do not appear to play a role in the activation of mTORC1 signaling in rat soleus muscle in response to passive stretching.

Keywords: skeletal muscle, mechanotransduction, passive stretch, Piezo1 channels, gadolinium, Yoda1, mTORC1, p70S6K, rpS6, 4E-BP1

УДК 576.54

ВЛИЯНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА БЕЛОК ТРАНСПОРТЕР ABCG2 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ Сасо-2

© 2023 г. А. А. Слепнев^а, Ю. В. Абаленихина^{а, *}, Н. М. Попова^а,
А. В. Шулькин^а, Е. Н. Якушева^а

^аРязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 06.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

ABCG2-белок (BCRP, белок резистентности рака молочной железы) – эффлюксный трансмембранный белок, принимающий участие в транспорте эндо- и экзогенных веществ, а также развитии резистентности опухолей к химиотерапии. В рамках настоящей работы оценивалось влияние половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2, а также роль орфанных рецепторов (фарназоид X рецептора (FXR), конститутивного андростанового рецептора (CAR), прегнан X рецептора (PXR), печеночного X рецептора подтипа альфа (LXRα)) в данном процессе. Количество ABCG2 оценивали методом вестерн-блот. Гормоны использовали в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и длительностью экспозиции 24 ч. Все гормоны во всех концентрациях вызывали повышение количества ABCG2. Ингибирование PXR и FXR препятствовало повышению уровня ABCG2 под действием прогестерона. Подавление CAR и PXR частично уменьшало экспрессию ABCG2, вызванную эстрадиолом по сравнению с изолированным воздействием эстрогена, но все равно уровень транспортера превышал показатели контроля. Ингибирование PXR и FXR снижало индуцирующее действие тестостерона, тем не менее уровень транспортера превышал показатели контроля. Таким образом, в ходе исследования было показано, что все половые гормоны во всех концентрациях повышали количество ABCG2, причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона – FXR и PXR.

Ключевые слова: ABCG2, белок резистентности рака молочной железы, орфанные рецепторы, клеточная линия Сасо-2

DOI: 10.31857/S023347523050109, **EDN:** NXXQGR

ВВЕДЕНИЕ

ABCG2-белок (BCRP, белок резистентности рака молочной железы) – мембранный транспортер массой 75 кДа, который впервые был идентифицирован в линии клеток рака молочной железы человека (MCF-7/AdrVp). Данные клетки характеризовались АТР-зависимым механизмом, который уменьшал внутриклеточное накопление и токсичность химиотерапевтического препарата митоксантрона [1].

В настоящее время установлено, что ABCG2 является членом суперсемейства ABC-транспортеров человека (подсемейство G) и использует гидролиз АТР для активного транспорта субстрата против их электрохимического градиента из клеток во внеклеточное пространство, биологические жидкости и полости органов. Функциональная единица ABC-транспортеров характеризуется двумя нуклеотид-связывающими домена-

ми (NBD) и двумя трансмембранными доменами (TMD), которые вместе образуют полость транслокации субстрата.

В отличие от многих других членов суперсемейства ABC-транспортеров, ген *ABCG2* кодирует половину белковой молекулы ABCG2 с одной цитоплазматической областью NBD, за которой следует одна область TMD, состоящая из шести α-спиралей, необходимых для распознавания и транспорта субстрата. Недавний анализ кристаллической структуры показал, что ABCG2 существует как в димерном, так и в тетрамерном состоянии, состоящем из двух димеров [2, 3].

ABCG2 обладает широкой субстратной специфичностью и способен транспортировать структурно и химически несвязанные вещества эндогенной и экзогенной природы, например, митоксантрон, метотрексат, доксорубин, топотекан, а также порфирины, желчные кислоты и эстроны [4].

ABCG2 экспрессируется в гепатоцитах, энтероцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров в мозге, тестикулах, плаценте, а также в опухолевых клетках, где он выполняет важнейшую защитную роль, ограничивая клеточное и тканевое накопление ксенобиотиков [5, 6]. Кроме того, ABCG2 принимает участие в выведении мочевой кислоты в проксимальных канальцах почек, и снижение его активности, например, в результате полиморфизмов в гене, кодирующем транспортер, может предрасполагать к развитию подагры [7].

Механизмы регуляции ABCG2 активно изучаются в настоящее время. Учитывая высокую экспрессию ABCG2 в опухолевых клетках, чувствительных к женским половым гормонам, а также в синцитиотрофобластах плаценты в ряде исследований было показано влияние половых гормонов на данный белок-транспортер.

Обработка ER-позитивных клеток (ER – рецептор эстрогена) рака молочной железы человека T47D:A18 10 нМ 17 β -эстрадиолом в течение 24 ч индуцировала увеличение мРНК ABCG2 в 3 раза. Более того, мутации и делеции эстроген-респонсивного элемента в промоторе ABCG2 соответственно ослабляли и отменяли эту индукцию, предполагая прямую регуляторную роль эстрогена [8]. Однако клеточная линия T47D (протоколная карцинома молочной железы), трансфицированная конструкцией люциферазы промотора ABCG2, показала, что обработка 17 β -эстрадиолом (0.1–10000 нМ) в течение 24 ч не влияла на активность люциферазы. Авторы предположили, что отсутствие промоторной активности может быть связано с низким эндогенным уровнем ER α в этих клетках. Трансфекция клеточной линии T47D конструкцией с ER α приводила к значительной индукции активности люциферазы после обработки 17 β -эстрадиолом [9].

Эстрадиол в концентрации 100 нМ при воздействии в течение 12 и 48 ч повышал экспрессию мРНК ABCG2 (12 ч) и уровень белка (48 ч) в 1.5 раза по сравнению с контрольными носителями в первичных трофобластах, выделенных из доношенных плацент человека [10].

Инкубация клеточной линии хориокарциномы человека BeWo с прогестероном (1–10 мкМ) в течение 72 ч индуцировала экспрессию мРНК и белка ABCG2 до 2 раз [11]. Кроме того, прогестерон уменьшал внутриклеточное накопление классического субстрата ABCG2 митоксантрона, что согласуется с повышенной активностью транспортера [12].

В исследовании Yasuda и соавт. трансфицировали клеточную линию T47D плазмидой с промотором ABCG2 и люциферазой. После воздействия ряда концентраций прогестерона (1 нМ–10 мкМ) в течение 24 ч было продемонстрировано

~2.6-кратное повышение активности люциферазы. Активацию люциферазы можно было инвертировать при добавлении 100 нМ мифепристона (RU-486) – стероидного гормона, сходного по структуре с природным прогестероном [9]. Интересно, что после обработки прогестероном (0.0001 нМ–10 мкМ) в течение более длительного периода времени (48 ч) экспрессия и активность ABCG2 значительно снижались как в клеточных линиях T47D, так и в MCF-7 [13, 14].

Таким образом, в данных исследованиях были получены противоречивые результаты. При этом работы были выполнены преимущественно на опухолевых клетках-мишенях для женских половых гормонов. В то же время, учитывая локализацию ABCG2 не только в опухолевых клетках и клетках репродуктивной системы, но и в органах, участвующих в фармакокинетике лекарственных веществ (например, кишечнике, печени), актуальным является изучение влияния половых гормонов на ABCG2 и в клетках данных органов. Влияние тестостерона на данный белок-транспортер в доступной литературе обнаружено не было.

Учитывая низкую экспрессию рецепторов половых гормонов в кишечнике, можно предположить, что прогестерон, эстрадиол и тестостерон будут оказывать свои эффекты через другие рецепторы. С этих позиций обращают на себя внимание орфанные рецепторы, являющиеся членами суперсемейства ядерных рецепторов. Своё название они получили из-за того, что в отличие от классических ядерных рецепторов для них не были известны эндогенные лиганды [15]. На данный момент считается, что лигандом печеночного X рецептора подтипа альфа (LXR α) являются окистеролы, конститутивного андростанового рецептора (CAR) – андростан, прегнан X рецептора (PXR) – прегненолон 16 α -карбонитрил, фарназоид X рецептора (FXR) – желчные кислоты [16–18].

Доказана важная роль LXR α в регуляции метаболизма липидов и холестерина, CAR и PXR – внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного баланса, FXR в регуляции синтеза желчных кислот. Кроме того, все эти рецепторы (LXR α , CAR, PXR, FXR) могут принимать участие в регуляции ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохромов P450), а также белков-транспортеров [19].

В ряде исследований было показано, что половые гормоны могут влиять на LXR α [20], CAR [21], PXR [22], FXR [23, 24].

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение воздействия половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Caco-2, а также оценка роли орфанных рецепторов (фарназоид X рецептора, конститутивного андростанового рецептора, прегнан X рецептора,

печеночного X рецептора подтипа альфа) в данном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, Германия), с добавлением L-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich) соответственно.

Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие ABCG2 [25].

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. Прогестерон (Sigma-Aldrich, США), эстрадиол (Sigma-Aldrich), тестостерон (Sigma-Aldrich), добавляли к монослою клеток в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. Клетки контрольной группы инкубировали в течение 24 ч в питательной среде с добавлением этанола (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0.01%.

Для оценки роли орфанных рецепторов (LXR α , CAR, PXR, FXR) совместно с половыми гормонами в концентрации 10 мкМ к клеткам добавляли ингибитор LXR α 3-(3,4-Диметоксифенил)-N-[4-(трифлуорометил)фенил]-2-пропенамид (TFCA, 30 мкМ, Sigma-Aldrich) [26], ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA1, 10 мкМ, Tocris, Великобритания) [27], ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ, Sigma-Aldrich) [28], ингибитор FXR тауро- β -холевую кислоту в концентрации 200 мкМ (β -ТА, Sigma Aldrich) [29]. Ингибиторы добавляли за 30 мин до внесения гормонов.

После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с поверхности лунок раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich), трижды промывали раствором фосфатного буфера (Bio-Rad, США) и лизировали в буфере RIPA (Sigma-Aldrich) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ гидрохлорида 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил-фторида (AEBSF), 0.3 мкМ апротинин, 130 мкМ бестатин, 1 мМ EDTA, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64), 1 мкМ лейпептин (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин

при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000g (CM-50, Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических исследований.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорд (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [30].

Определение относительного количества ABCG2 в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. 20 мкг белков супернатанта подвергли электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad) в буферной системе Laemmli (BioRad). Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β -меркаптоэтанол (Bio-Rad) в соотношении 1 : 2, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели пропускали при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, Bio-Rad) с использованием Mini Trans-Blot (Bio-Rad) в течение 10 мин при 20 В и 1.3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (Bio-Rad), содержащим 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре. Детекцию белков ABCG2 проводили с использованием первичных кроличьих антител (ABCG2 antibody, CSB-PA001081-GA01HU, Cusabio, США) в концентрации 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker (Bio-Rad) в течение ночи при +4°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных антител козы (Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США) в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (Bio-Rad). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad).

Молекулярная масса ABCG2 была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, Bio-Rad).

Содержание ABCG2 оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышиные моноклональные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (Invitrogen), разведение 1 : 1000, вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen), разведение 1 : 4000).

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ GraphPad Prism Version 9.5.0. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической зна-

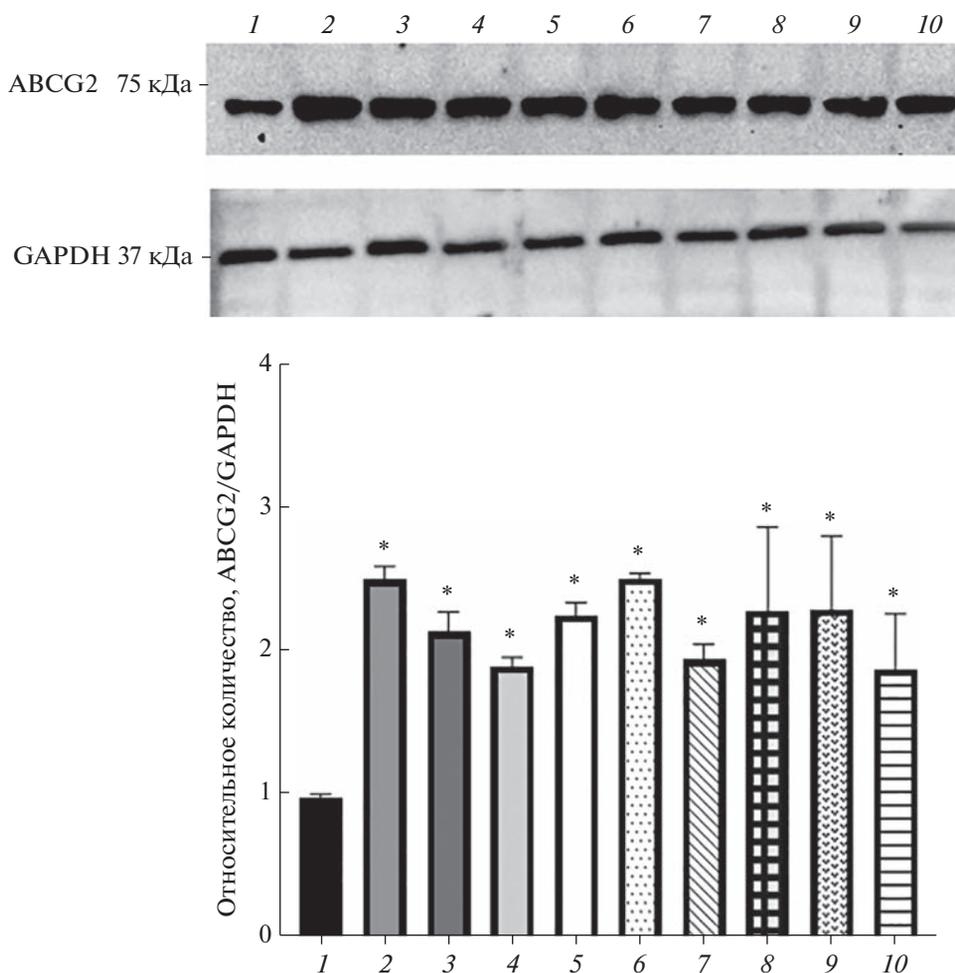


Рис. 1. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле и при воздействии прогестерона, эстрадиола и тестостерона: 1 – контроль, 2, 3, 4 – прогестерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно; 5, 6, 7 – эстрадиол в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно; 8, 9, 10 – тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно. * $p < 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа: $F = 7.27$, $p < 0.0001$.

чимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние половых гормонов на относительное количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2. Инкубирование клеток линии Сасо-2 с прогестероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ привело к повышению уровня белка ABCG2 на 151.4, 114.9 и 90.3% соответственно ($p < 0.0001$ для каждой серии) относительно контрольного значения, принятого за 1 (рис. 1 (1, 2, 3, 4)).

Воздействие эстрадиола в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в течение 24 ч увеличивало относительное количество ABCG2 на 126.2, 152.0 и 95.7% ($p < 0.0001$ для каждой серии) соответственно по сравнению с контролем (рис. 1 (1, 5, 6, 7)).

При инкубации клеток с тестостероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ также отмечалось увеличение относительного количества ABCG2 на 129.5, 130.2 и 88.5% соответственно ($p < 0.01$ для каждой серии) относительно контрольных значений (рис. 1 (1, 8, 9, 10)).

Таким образом, в ходе исследования установлено, что все половые гормоны (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) повышают количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием прогестерона. Прогестерон в концентрации 10 мкМ вызывал повышение относительного количества ABCG2 на 118.3% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 2 (б)). Ингибитор PXR кетоконазол и ингибитор FXR тауро-β-холевая кислота препятствовали повышению ABCG2 под действием прогестерона, его относительное количество достоверно не отличалось от показателей контроля и снижалось на 51.5

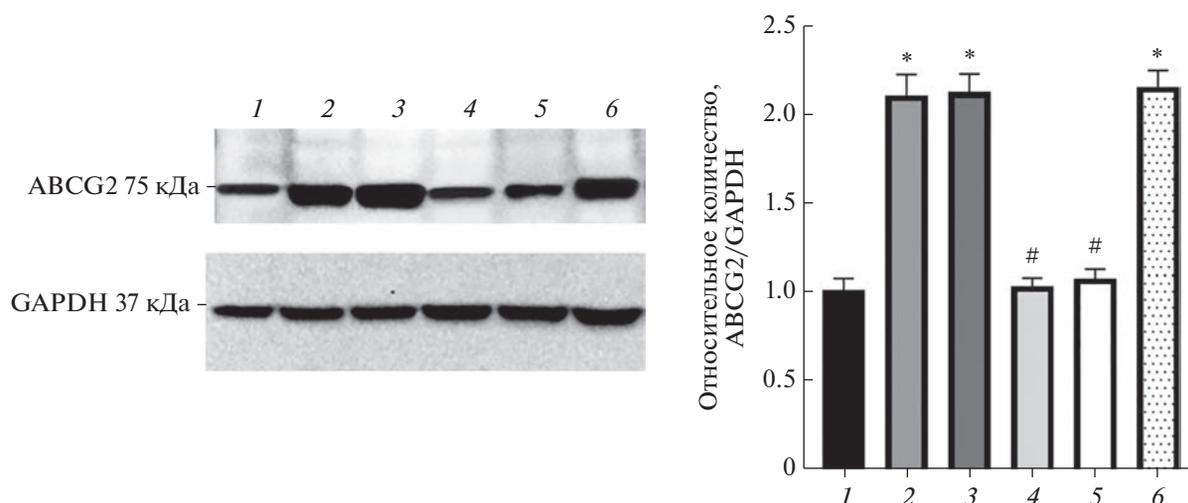


Рис. 2. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии прогестерона в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибиторами LXR α – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетоконазола (4), тауро- β -холевой кислотой (5). * $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 153, p < 0.0001$.

и 50.1% соответственно относительно изолированного воздействия гормона (рис. 2 (1, 4, 5)).

Ингибитор LXR α TFCA и ингибитор CAR CINPA1 достоверного эффекта на индуцирующее действие прогестерона (10 мкМ) не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 113.5% ($p < 0.0001$) и 115.4% ($p < 0.0001$) и достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 2 (1, 2, 3)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием прогестерона принимают участие FXR и PXR.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием эстрадиола. Эстрадиол в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество ABCG2 на 156.2% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 3 (6)).

Ингибитор CAR CINPA1 и ингибитор PXR кетоконазол вызывали снижение количества ABCG2 в клетках линии Сасо-2 при воздействии эстрадиола в концентрации 10 мкМ на 21.1% ($p = 0.0002$) и 22.3% ($p < 0.001$) соответственно по сравнению с изолированным применением эстрогена, но все равно уровень транспортера превышал показатели контроля на 102.1 и 99.1% соответственно ($p < 0.0001$) (рис. 3 (1, 3, 4)).

Ингибитор LXR α TFCA и ингибитор FXR тауро- β -холевая кислота достоверного эффекта на индуцирующее действие эстрадиола (10 мкМ) не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 137.4 и 166.3% соответственно ($p < 0.0001$ для обеих групп), достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 3 (1, 2, 5)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола принимают участие CAR и PXR.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием тестостерона. Тестостерон в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество ABCG2 на 135.6% ($p < 0.0002$) по сравнению с контролем (рис. 4 (6)).

Ингибитор PXR кетоконазол и ингибитор FXR тауро- β -холевая кислота снижали индуцирующее действие тестостерона, количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2 снижались на 30.6% ($p = 0.02$) и 18.1% ($p = 0.05$) соответственно по сравнению с изолированным применением тестостерона, тем не менее уровень транспортера превышал показатели контроля на 63.4% ($p = 0.05$) и 93.0% ($p = 0.01$) относительно контроля (рис. 4 (1, 4, 5)).

Ингибитор LXR α TFCA и ингибитор CAR CINPA1 достоверного эффекта на индуцирующее действие тестостерона не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 134.1% ($p = 0.0002$) и 97.9% ($p = 0.004$) и достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 4 (1, 2, 3)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием тестостерона принимают участие FXR и PXR.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования оценивалось воздействие половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2, являю-

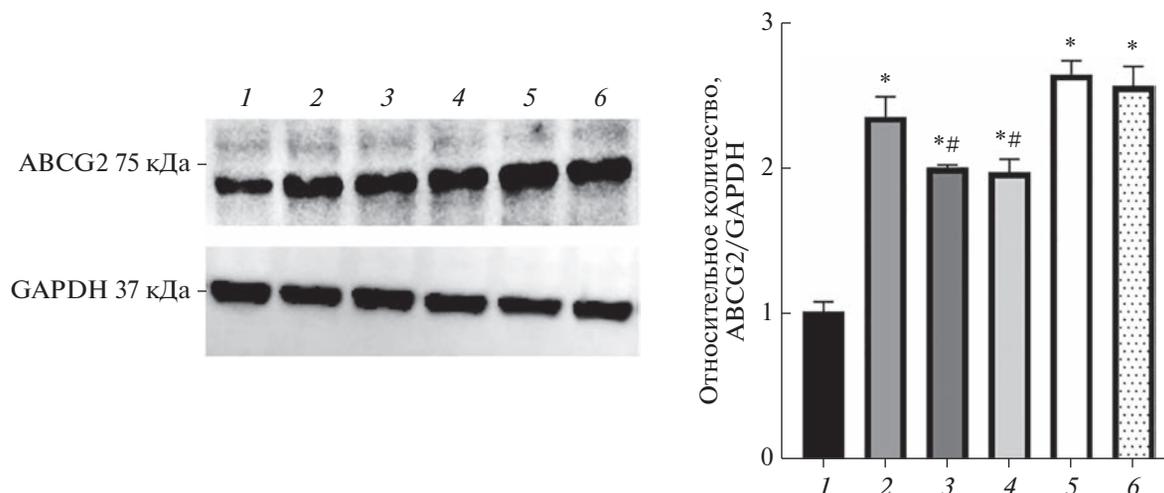


Рис. 3. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Caco-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии эстрадиола в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибиторами LXR α – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетокеназола (4), FXR – тауро- β -холевой кислотой (5). * $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p < 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 110, p < 0.0001$.

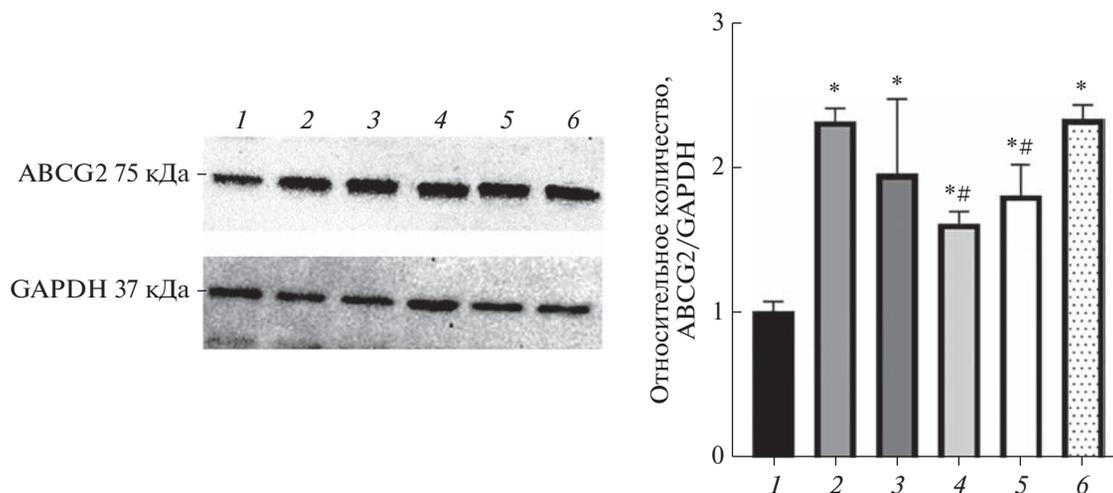


Рис. 4. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Caco-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии тестостерона в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибитором LXR α – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетокеназола (4), FXR – тауро- β -холевой кислотой (5). * $p < 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p \leq 0.05$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 13, p < 0.0002$.

шейся моделью тонкокишечного эпителия, а также роль орфанных рецепторов (LXR α , CAR, PXR, FXR) в механизмах регуляции белка-транспортера в данных экспериментальных условиях.

В ходе настоящего исследования было установлено, что все изученные половые гормоны (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) повышают относительное количество ABCG2 в клетках Caco-2.

Выделяют следующие механизмы регуляции ABCG2: изменение активности синтезированной

го белка, изменение экспрессии гена, кодирующего ABCG2, полиморфизм в гене ABCG2, посттрансляционная модификация молекулы транспортера, амплификация гена, деметилирование ДНК, влияние микроРНК, модификация гистонов [31].

При этом основная роль отводится изменению экспрессии гена ABCG2 под действием транскрипционных факторов, поэтому именно этот механизм и был изучен в данном исследовании.

В качестве изучаемых факторов транскрипции были выбраны орфанные рецепторы LXR α , CAR, PXR, FXR, поскольку они являются основными регуляторами ферментов биотрансформации и белков-транспортёров, а также взаимодействуют с половыми гормонами. Для оценки роли орфанных рецепторов в механизме влияния половых гормонов на относительное количество ABCG2 были применены их специфические ингибиторы.

Для инактивации LXR α использовали N-(4-трифторметилфенил)3,4-диметоксидинамид (TFCA). Считается, что TFCA ингибирует активацию лиганд-связывающего домена LXR α за счет водородной связи с Arg305 в области H5 этого домена [26]. CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1) использовали в качестве ингибитора CAR. Он блокирует лиганд-связывающий домен CAR, а также подавляет его взаимодействие с коактиваторами [27].

Ингибирование PXR осуществляли с помощью кетоконазола. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с AF-2, областью лиганд-связывающего домена PXR, и таким образом подавляет его активацию [32].

Тауро- β -холевая кислота использовалась в качестве ингибитора FXR. Предполагается, что она взаимодействует с лиганд-связывающим карманом FXR и препятствует реализации его активности [29].

В ходе настоящего исследования было показано, что в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а под действием тестостерона и прогестерона – FXR и PXR.

При этом ингибирование орфанных рецепторов при действии эстрадиола и тестостерона не предотвращало полностью индуцирующее действие гормонов, количество ABCG2 превышало показатели контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что видимо в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола и тестостерона принимают участие и другие сигнальные пути.

В клетках линии Caco-2 описана экспрессия эстрогеновых рецепторов (преимущественно подтип бета) [33] и тестостероновых рецепторов [34], поэтому логично предположить, что действие данных гормонов будет реализовываться через соответствующие рецепторы.

В промоторе гена ABCG2 обнаружено эстроген-респонсивный элемент (регион в промоторе – 243–115) [8], а также гестаген-респонсивный элемент (регион в промоторе – 243–115) [12]. В то же время в клетках линии Caco-2 выявлен крайне низкий уровень прогестероновых рецепторов [35].

Наше исследование показало, что в регуляции ABCG2 под действием всех половых гормонов принимал участие FXR. Полученные результаты согласуются с данными литературы о роли этого рецептора в регуляции белка транспортёра. Так,

например, в исследовании на клетках рака ободочной кишки было показано, что цисплатин-индуцированная химиорезистентность, опосредованная ABCG2, развивается с участием FXR [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследовании на клетках линии Caco-2 было установлено, что половые гормоны вызывают повышение количества белка-транспортёра ABCG2, причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона – FXR и PXR.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **95** (26), 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
2. Khunweeraphong N., Stockner T., Kuchler K. 2017. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Sci. Rep.* **7** (1), 13767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>
3. Rosenberg M.F., Bikadi Z., Chan J., Liu X., Ni Z., Cai X., Ford R.C., Mao Q. 2010. The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone. *Structure*. **18** (4), 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.017>
4. Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M.F., Mao Q. 2010. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Cur. Drug Metabolism*. **11** (7), 603–617. <https://doi.org/10.2174/138920010792927325>
5. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. **61** (8), 3458–3464.
6. Natarajan K., Xie Y., Baer M.R., Ross D.D. 2012. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem. Pharm.* **83** (8), 1084–1103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.002>
7. Stiburkova B., Pavelcova K., Zavada J., Petru L., Simek P., Cepek P., Pavlikova M., Matsuo H., Merri-man T.R., Pavelka K. 2017. Functional non-synony-

- mous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (Oxford)*. **56** (11), 1982–1992.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex295>
8. Ee P.L., Kamalakaran S., Tonetti D., He X., Ross D.D., Beck W.T. 2004. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.* **64** (4), 1247–1251.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3583>
 9. Yasuda S., Kobayashi M., Itagaki S., Hirano T., Iseki K. 2009. Response of the ABCG2 promoter in T47D cells and BeWo cells to sex hormone treatment. *Mol. Biol. Rep.* **36** (7), 1889–1896.
<https://doi.org/10.1007/s11033-008-9395-0>
 10. Evseenko D.A., Paxton J.W., Keelan J.A. 2007. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab. Dispos.* **35** (4), 595–601.
<https://doi.org/10.1124/dmd.106.011478>
 11. Wang H., Zhou L., Gupta A., Vethanayagam R.R., Zhang Y., Unadkat J.D., Mao Q. 2006. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* **290** (5), 798–807.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00397.2005>
 12. Wang H., Lee E.W., Zhou L., Leung P.C., Ross D.D., Unadkat J.D., Mao Q. 2008. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Mol. Pharm.* **73** (3), 845–854.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.041087>
 13. Wu X., Zhang X., Sun L., Zhang H., Li L., Wang X., Li W., Su P., Hu J., Gao P., Zhou G. 2013. Progesterone negatively regulates BCRP in progesterone receptor-positive human breast cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* **32** (2), 344–354.
<https://doi.org/10.1159/000354442>
 14. Wu X., Zhang X., Zhang H., Su P., Li W., Li L., Wang Y., Liu W., Gao P., Zhou G. 2012. Progesterone receptor downregulates breast cancer resistance protein expression via binding to the progesterone response element in breast cancer. *Cancer Sci.* **103** (5), 959–967.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02245.x>
 15. Mazaira G.I., Zgajnar N.R., Lotufo C.M., Daneribecerra C., Sivils J.C., Soto O.B., Cox M.B., Galigniana M.D. 2018. The nuclear receptor field: A historical overview and future challenges. *Nucl. Receptor Res.* **5**, 101320.
<https://doi.org/10.11131/2018/101320>
 16. Shi Y. 2007. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov. Today*. **12** (11–12), 440–445.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.04.006>
 17. Serviddio G., Bellanti F., Vendemiale G. 2014. Oysterols in the orchestra of liver cell metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **1**, S6.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.838>
 18. Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. 2022. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism. *Mol. Cell Endocrinol.* **548**, 111618.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111618>
 19. Krasowski M.D., Ni A., Hagey L.R., Ekins S. 2011. Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Mol. Cell Endocrinol.* **334** (1–2), 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.016>
 20. Jin B., Wang W., Bai W., Zhang J., Wang K., Qin L. 2017. The effects of estradiol valerate and remifemin on liver lipid metabolism. *Acta Histochem.* **119** (6), 610–619.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.06.004>
 21. Kawamoto T., Kakizak S., Yoshinari K., Negishi M. 2000. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse CYP2B10 gene. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1897–1905.
<https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0547>
 22. Blumberg B., Sabbagh W., Juguilon H., Bolado J., van Meter C.M., Ong E.S., Evans R.M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* **12** (20), 3195–3205.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3195>
 23. Milona A., Owen B.M., Cobbold J.F., Willemsen E.C., Cox I.J., Boudjelal M., Cairns W., Schoonjans K., Taylor-Robinson S.D., Klomp L.W., Parker M.G., White R., van Mil S.W., Williamson C. 2010. Raised hepatic bile acid concentrations during pregnancy in mice are associated with reduced farnesoid X receptor function. *Hepatology.* **52** (4), 1341–1349.
<https://doi.org/10.1002/hep.23849>
 24. Wang S., Lai K., Moy F.J., Bhat A., Hartman H.B., Evans M.J. 2006. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology.* **147** (9), 4025–4033.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>
 25. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac. Res.* **7** (9), 902–910.
<https://doi.org/10.1023/A:1015937605100>
 26. Sim W.C., Kim D.G., Lee K.J., Choi Y.J., Choi Y.J., Shin K.J., Jun D.W., Park S.J., Park H.J., Kim J., Oh W.K., Lee B.H. 2015. Cinnamamides, novel liver X receptor antagonists that inhibit ligand-induced lipogenesis and fatty liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **355** (3), 362–369.
<https://doi.org/10.1124/jpet.115.226738>
 27. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. 2015. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* **87** (5), 878–889.
<https://doi.org/10.1124/mol.115.097782>
 28. Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D. 2010. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells. *Pharmacol. Res.* **62** (5), 426–431.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.07.001>
 29. Sayin S.I., Wahlström A., Felin J., Jäntti S., Marschall H.U., Bamberg K., Angelin B., Hyötyläinen T.,

- Orešič M., Bäckhed F. 2013. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* **17** (2), 225–235.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>
30. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7** (72), 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
31. Nakanishi T., Ross D.D. 2012. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin. J. Cancer.* **31** (2), 73–99.
<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320>
32. Wang H., Huang H., Li H., Teotico D.G., Sinz M., Baker S.D., Staudinger J., Kalpana G., Redinbo M.R., Mani S. 2007. Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs. *Clin. Cancer Res.* **13** (8), 2488–2495.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1592>
33. Campbell-Thompson M., Lynch I.J., Bhardwaj B. 2001. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* **61** (2), 632–640.
34. Gu S., Papadopoulou N., Gehring E.M., Nasir O., Dimas K., Bhavsar S.K., Föller M., Alevizopoulos K., Lang F., Stournaras C. 2009. Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses *in vitro* and reduce drastically tumor incidence *in vivo*. *Mol. Cancer.* **8**, 114.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-114>
35. Mahbub A.A. 2022. Therapeutic strategies and potential actions of female sex steroid hormones and their receptors in colon cancer based on preclinical studies. *Life (Basel).* **12** (4), 605.
<https://doi.org/10.3390/life12040605>
36. Herraiz E., Gonzalez-Sanchez E., Vaquero J., Romero M.R., Serrano M.A., Marin J.J., Briz O. 2012. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Mol. Pharm.* **9** (9), 2565–2576.
<https://doi.org/10.1021/mp300178a>

Influence of Sex Hormones on the ABCG2 Transport Protein in Caco-2 Cells

A. A. Slepnev¹, Yu. V. Abalenikhina¹ *, N. M. Popova¹, A. V. Shchulkin¹, E. N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of Russia, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Protein ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein) is an efflux transmembrane protein involved in the transport of endo- and exogenous substances, as well as in the development of tumor resistance to chemotherapy. In this work, the influence of sex hormones progesterone, estradiol, and testosterone on the relative amount of ABCG2 in Caco-2 cells was studied, as well as the role of orphan receptors (farnazoid X receptor (FXR), constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR), hepatic X receptor subtype alpha (LXRα)) in this process. The amount of ABCG2 was assessed by Western blot. Hormones were used at concentrations of 1, 10, and 100 μM, exposure time was 24 h. All hormones at all concentrations caused an increase in the amount of ABCG2. Inhibition of PXR and FXR prevented the increase in ABCG2 under the action of progesterone. Suppression of CAR and PXR reduced ABCG2 levels with estradiol compared with estrogen exposure alone, but still the transporter level was higher than in controls. Inhibition of PXR and FXR reduced the effect of testosterone; however, the level of the transporter exceeded the control values. Thus, our study showed that all sex hormones at all concentrations used increased the amount of ABCG2, that CAR and PXR are involved in the implementation of the action of estradiol, and that FXR and PXR are involved in the implementation of the effects of testosterone and progesterone.

Keywords: ABCG2, breast cancer resistance protein, orphan receptors, cell line Caco-2

УДК 547.461.4:616.831-002:612.013.1:616.8-008.615:599.323.4

ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТ ОГРАНИЧИВАЕТ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА СТАРЫХ КРЫС

© 2023 г. О. Л. Терехина^а, Ю. И. Кирова^{а, *}

^аНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
Москва, 125315 Россия

*e-mail: bioenerg@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 30.05.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

В старении организма и развитии возраст-ассоциированных заболеваний триггерным механизмом признается гиперактивация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой нейроэндокринной оси, гиперсекреция глюкокортикоидов, оказывающих при чрезмерной и долговременной стимуляции воспалительно-дегенеративные эффекты. Хронический стресс усугубляет глюкокортикоид-зависимые атрофические изменения в стареющем мозге, усиливает нейровоспаление и неврологическую дисфункцию, является ключевым фактором риска болезни Альцгеймера. В коррекции асептического нейровоспаления у лиц пожилого и старческого возраста патогенетически обосновано применение противовоспалительных агентов, проявляющих антиглюкокортикоидные (проанаболические) и антиглутаматные (антиэксайтотоксические) эффекты. Сукцинат/SUCNR1-сигнализация задействована в развитии иммуномодулирующих, трофических, антигипоксических эффектов, однако ее роль в механизмах стресс-реакции остается неисследованной. Цель работы заключалась в оценке влияния сукцинат/SUCNR1-сигнализации на развитие стресс-индуцированного нейровоспаления в коре головного мозга старых крыс. Работа была выполнена на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 18 мес. Хронический иммобилизационный стресс моделировали путем 6-часового ограничения подвижности животных в индивидуальных пластиковых пеналах ежедневно на протяжении 5 дней. В качестве формы сукцината, преодолевающей гематоэнцефалический барьер, был использован препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат). Мексидол вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг ежедневно на протяжении 5 дней за 15 мин до начала стрессирования. В образцах коры головного мозга (КГМ) методом иммуноблоттинга определяли содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α), противовоспалительных цитокинов (TGF- β 1, IL-10), глюкокортикоидных рецепторов (GR α), транскрипционного коактиватора PGC-1 α , сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91, фактора роста эндотелия сосудов VEGF. Было показано, что хронический иммобилизационный стресс вызывал увеличение уровня IL-1 β и TNF- α в курсе стрессирования, что сопровождалось снижением содержания противовоспалительных цитокинов, SUCNR1, GR α , PGC-1 α . Курсовое введение ЭМГП сукцината ограничило развитие стресс-индуцированного нейровоспаления в КГМ старых крыс, предотвратило снижение уровня SUCNR1, IL-10, TGF- β 1, PGC-1 α , GR α . Исследование впервые раскрывает стресс-протекторный потенциал сукцинат/SUCNR1-сигналинга в мозге старых крыс, связанный с активацией PGC-1 α -зависимых противовоспалительных механизмов в условиях хронического стресса.

Ключевые слова: старение, нейровоспаление, стресс, сукцинат, SUCNR1, крысы

DOI: 10.31857/S0233475523050122, **EDN:** QZWKTB

ВВЕДЕНИЕ

Старение организма сопровождается прогрессивной системной вялотекущей асептической воспалением, провоцирующей и потенцирующей развитие возраст-ассоциированных патологий. Несмотря на высокую медико-социальную значимость проблемы старческого персистирующего воспаления, причины и механизмы этого явления остаются не вполне понимаемыми, также как

подходы к его коррекции [1]. Специфической характеристикой старения является гиперактивация нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси и гиперпродукция глюкокортикоидов (ГК), которая признается триггерным и центральным механизмом в биологии старения человека [2]. Наиболее пагубно гиперкортизолемиа влияет на нервную ткань, поскольку вызывает супрессию биогенеза митохон-

дрий и ангиогенеза, дистрофические изменения нейронов и глии, амилоидогенез, нейровоспаление [3–5]. ГК через активацию глюкокортикоидных рецепторов (ГР) индуцируют экспрессию субъединиц ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR), являются аллостерическими активаторами NMDA-рецепторов, потенцируют эксайтотоксическую гибель нейронов и NMDA-рецептор-зависимую провоспалительную поляризацию микроглии [6, 7].

Хронический стресс в старческом возрасте усугубляет ГК/ГР-зависимые воспалительно-дегенеративные изменения в гиппокампе и префронтальной коре, способствует снижению когнитивных функций и рассматривается как ведущий фактор в развитии болезни Альцгеймера [3, 4]. Таким образом, в коррекции старческого асептического нейровоспаления патогенетически обосновано применение противовоспалительных агентов, проявляющих антиглюкокортикоидные (проанаболические) и антиглутаматные (антиэксайтотоксические) эффекты [3].

В качестве клинически значимых препаратов при возрастном неразрешимом асептическом нейровоспалении могут быть использованы агонисты ядерных рецепторов/лигандзависимых факторов транскрипции, сочетающих противовоспалительную и антиглюкокортикоидную активность: селективные модуляторы эстрогеновых и андрогеновых рецепторов, тиазолидиндионы (агонисты PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor), фибраты (агонисты PPAR α), статины (агонисты ERR α , estrogen related receptor), для многих из которых при продолжительном приеме показана кардио- и гепатотоксичность, риск тромбоза и онкологических заболеваний [8–10]. В связи с чем разработка эффективных и безопасных фармакоагентов, купирующих хроническое неразрешимое воспаление, вызванное глюкокортикоидной гиперстимуляцией и дефицитом проанаболических регуляторов, является одним из наиболее перспективных фармакологических подходов (resolution pharmacology) к коррекции старческого персистирующего воспаления [11].

В исследованиях 2016–2022 годов была установлена иммуномодулирующая активность эндогенного метаболита, интермедиата цикла трикарбоновых кислот янтарной кислоты (сукцинат), реализуемая через активацию специфического G-белок-сопряженного сукцинатного рецептора SUCNR1, экспрессируемого иммунocyтaми всех типов [12]. SUCNR1 является сенсором экстраклеточного сукцината, продукция которого увеличивается при гипоксии/ишемии и воспалении в восстановительном (обращенном) цикле Кребса [13]. В 2021 году было показано, что сукцинат SUCNR1 опосредованно вызывает противовоспалительную гиперполяризацию макрофагов [14].

SUCNR1 отрицательно регулирует воспалительную активацию макрофагов, снижая экспрессию мРНК IL-1 β и секрецию IL-6 и TNF- α [15]. Сукцинат/SUCNR1-сигнализация в центральной нервной системе (ЦНС) оказывает антигипоксические и трофические эффекты, такие как активация ангиогенеза, митохондриогенеза, аксонального роста [16–18]. Более того, сукцинат проявляет противосудорожное, анксиолитическое, седативное действие и потенциально антиэксайтотоксическую активность [19–21]. В 2021–2022 годах нами было показано, что курсовое применение сукцинатсодержащего препарата мексидола (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат) оказывает противовоспалительное действие при хроническом старческом нейровоспалении, увеличивает экспрессию маркеров и формирование морфологических черт гомеостатического (разветвленного) фенотипа микроглии в коре головного мозга и CA1 поле гиппокампа стареющих крыс [22, 23].

Стресс сопряжен как с нейровоспалением, так и с гипоксией [3], однако роль сукцината как ключевого антигипоксического и противовоспалительного (иммунометаболит) сигнала в развитии стресс-реакции остается неисследованной.

Цель работы заключалась в оценке влияния ЭМГП сукцината на развитие стресс-индуцированного нейровоспаления в коре головного мозга стареющих крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было выполнено на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 18 мес ($n = 120$), выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии” при естественной смене суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434–2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов были утверждены локальным этическим комитетом ФГБНУ “НИИОПП” (протокол утверждения планируемого исследования № 1 от 03.03.2022, протокол утверждения завершенного исследования № 1 от 01.02.2023).

Хронический иммобилизационный стресс моделировали путем ограничения подвижности животных в индивидуальных пластиковых пеналах (15 × 9 × 9 см) с вентиляционными отверстиями. На протяжении стрессирующего воздействия животные не имели доступа к пище и воде, находились под ярким направленным освещением. Продолжительность иммобилизации составляла 6 ч в

день (12:00–18:00). Стрессирование проводили ежедневно в течение 5 дней [24].

В качестве формы сукцината, преодолевающей гематоэнцефалический барьер, в работе был использован сукцинатсодержащий препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат, 50 мг/мл, ООО “НПК “ФАРМАСОФТ”) для внутрибрюшинного (в/б) введения в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 5 дней за 15 мин до начала стрессирования. С целью оценить влияние ЭМГП на анализируемые показатели был использован препарат эмоксипин (ЭМГП гидрохлорид, 10 мг/мл, Московский эндокринный завод) для в/б введения в дозе 68 мг/кг, содержащей ЭМГП в количестве (54 мг/кг), эквивалентном его содержанию в примененной дозе мексидола. ЭМГП гидрохлорид вводили ежедневно в течение 5 дней за 15 мин до начала стрессорного воздействия.

Было выполнено три экспериментальные серии: (1) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс; (2) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс с предварительным введением ЭМГП сукцината; (3) 5-дневное стрессирование 18-месячных крыс с предварительным введением ЭМГП гидрохлорида. В каждой серии были сформированы пять контрольных групп ($n = 3$ в каждой) и пять опытных групп ($n = 5$ в каждой) в соответствии с количеством дней стрессирования. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом сразу после стресс-сеанса. Мозг извлекали, отделяли на льду кору головного мозга (КГМ). Образцы КГМ быстро замораживали и хранили в жидком азоте.

Замороженные образцы КГМ растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния. Навески массой 100 мг лизировали на льду в течение 30 мин в охлажденном до 2°C лизис-буфере (в соотношении 1V ткань : 6V лизис-буфер; 50 мМ NERES, pH 7.6, 150 мМ NaCl, 2 мМ EGTA, 1% тритон X-100, 10% глицерин, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ AEBSF, 60 мкг/мл апротинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А) (Sigma-Aldrich, США) [25]. После центрифугирования (30 мин, 14000g, 4°C) супернатант, содержащий искомые белки, смешивали с загрузочным буфером (4× Laemmli Sample Buffer), инкубировали 5 мин при 95°C и хранили при –80°C. Концентрацию общего белка в пробах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорд. Белки лизата КГМ разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроэлюцией. Мембрану инкубировали с первичными антителами (разведение 1 : 500, 14 ч, 4°C, Santa Cruz Biotechnology, США) против IL-1β (interleukin 1β; sc-515598), TNF-α (tumor necrosis factor α; sc-52746), IL-10 (interleukin 10; sc-57245), TGF-β1 (transforming growth fac-

tor β1; sc-130348), PGC-1α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1α, sc-518025), GRα/β (glucocorticoid receptor α/β, sc-393232), SUCNR1 (succinate receptor 1, sc-50466), VEGF (vascular endothelial growth factor, sc-365578), вторичными антителами (разведение 1 : 5000, 1 ч, 4°C), конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-mouse sc-516102, anti-rabbit sc-2030). В качестве контроля использовали антитела к актину (sc-376421). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, США). О содержании искомых белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с использованием непараметрического рангового *U*-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что в КГМ 18-месячных стареющих крыс в сравнении с 3-месячными (молодыми) и 6-месячными (средневозрастными) крысами развивается воспалительная поляризация микроглии и хроническое умеренное нейровоспаление: увеличивается содержание провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α, снижается уровень экспрессии иммуносупрессивного цитокина TGF-β1, а также сукцинатного рецептора SUCNR1 и одного из ключевых регуляторов реализации противовоспалительных и проанаболических программ (митохондриогенез, ангиогенез) – транскрипционного коактиватора PGC-1α [17, 22], вызывающего трансрепрессию провоспалительного фактора транскрипции NF-κB (nuclear factor kappa B), активацию широкого спектра противовоспалительных факторов транскрипции (ERRα, PPARα, PPARγ, GRα, рецепторы половых, тиреоидных гормонов) и необходимого для противовоспалительной поляризации микроглии/макрофагов [26–31].

Модель хронического иммобилизационного стресса, использованная в представленной работе, вызвала прогрессирующее в ходе повторяющихся стресс-сеансов увеличение содержания провоспалительных цитокинов IL-1β, TNF-α в КГМ 18-месячных крыс (на 40 и 25% соответственно после 5-го стресс-сеанса, рис. 1а, 1б), что происходило сопряженно с уменьшением содержания противовоспалительных цитокинов TGF-β1 и IL-10 на 20 и 30% соответственно (рис. 1в, 1г), супрессией GRα на 20% и PGC-1α на 40% (рис. 1д, 1е).

В условиях хронической иммобилизации в КГМ стареющих крыс происходило снижение содержания SUCNR1 и маркера ангиогенеза VEGF (на 20% после 5-го стресс-сеанса, рис. 1ж, 1з). Сукцинат/SUCNR1 служит определяющей сигнальной системой активации церебрального ангиогенеза в условиях гипоксического стресса [13, 16], что связано с экспоненциальным увеличением содержания сукцината и экспрессии SUCNR1 при гипоксии, однако у старых животных отмечается снижение эффективности сукцинат-продуцирующих механизмов [32], базовой экспрессии SUCNR1 [22] и в условиях хронического иммобилизационного стресса, что ведет к возрастному ослаблению сукцинат/SUCNR1-зависимых противогипоксических механизмов (ангиогенез) и гипоксической индукции механизмов воспаления [26]. В целом полученные данные указывают на развитие стресс-индуцированного воспаления в КГМ старых крыс, отражая известный феномен неконтролируемого воспалительного ответа микроглии стареющего мозга на иммунный стимул (праймирование микроглии) [26] и свидетельствуют о возрастзависимом снижении эффективности в ЦНС стресс-протекторных механизмов.

Введение ЭМГП сукцината старым крысам перед каждым эпизодом иммобилизации ограничивало развитие стресс-индуцированной экспрессии воспалительных цитокинов на протяжении курса стрессирования и предотвращало снижение экспрессии противовоспалительных цитокинов (рис. 1а–1з). Введение ЭМГП сукцината отменяло стрессорную супрессию $GR\alpha$, PGC-1 α , SUCNR1 и маркера активности сукцинатного рецептора VEGF в КГМ старых крыс (рис. 1д–1з). Курсовое введение ЭМГП гидрохлорида перед каждым стрессированием не оказывало значимого влияния на определяемые параметры, что указывает на ключевую роль сукцината в ограниченном стресс-индуцированном нейровоспалении в КГМ старых крыс.

При обсуждении роли сукцинат/SUCNR1-сигнализации в развитии стресс-реакции и стресс-индуцированного нейровоспаления необходимо подчеркнуть, что ГК – стресс-реализующие гормоны ГГН-оси, признаны самыми сильными

физиологическими противовоспалительными сигналами, которые оказывают на микроглию иммуносупрессивные эффекты, существенно превосходящие влияние широко применяемых противовоспалительных фармакопрепаратов (ибупрофена, индометацина, миноциклина). Микроглия экспрессирует ГР в высоких количествах, что делает ее чувствительной мишенью ГК [33]. Иммуносупрессивные эффекты ГК/ГР оказывают ДНК-независимо, напрямую взаимодействуя с провоспалительными факторами транскрипции (транспрессия по механизму белок-белкового взаимодействия), такими как NF- κ B, AP1 (activator protein 1), IRF (interferon regulatory factor), STAT (signal transducer and activator of transcription) [34]. Геномные ГР-опосредованные эффекты ГК являются провоспалительными, что особенно критично проявляется в нервной ткани и связано с: (1) индукцией субъединиц NMDA-рецептора, потенцированием глутаматной эксайтотоксичности и NMDA-рецептор-зависимой провоспалительной поляризации микроглии [6, 7]; (2) супрессией ангиогенеза и стимуляцией гипоксической провоспалительной поляризации микроглии [5]; (3) супрессией митохондриогенеза и сопряженным снижением выживаемости нейронов [4]; (4) индукцией генов амилоидного предшественника (APP) и амилоидогенного фермента BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1), накоплением β -амилоида, вызывающего воспалительную поляризацию микроглии [35]. В молодом и зрелом возрасте воспалительно-дегенеративные гено-опосредованные эффекты ГК/ГР блокируются антиглюкокортикоидными и противовоспалительными эффектами половых и тиреоидных гормонов: (1) половые гормоны являются естественными эндогенными антагонистами ГР [27]; (2) рецепторы половых гормонов гетеродимеризуются с ГР, отменяя транскрипционную активность последних [27]; (3) андрогеновый рецептор блокирует экспрессию кортикотропин-рилизинг-гормона, подавляя активность ГГН-оси [36]; (4) эстрогены и прогестерон являются аллостерическими активаторами ГАМК(A)-рецепторов, оказывая антиглутаматное и антиэксайтотоксическое действие [37]; (5) эстрогеновые (ЭР), андрогеновые (АР), тиреоидные рецепторы (ТР), подобно ГР, вызывают транспрессию провос-

Рис. 1. Динамика экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β (а), TNF- α (б), иммуносупрессивных цитокинов TGF- β 1 (в), IL-10 (г), глюкокортикоидных рецепторов ($GR\alpha$) (д), транскрипционного коактиватора PGC-1 α (е), сукцинатного рецептора SUCNR1 (ж), фактора роста эндотелия сосудов VEGF (з) в коре головного мозга старых (18-месячных) крыс на протяжении 5-дневного иммобилизационного стресса и при курсовом введении ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 5 дней, за 15 мин до стрессирования). Показаны результаты денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы, К – контроль, 1, 2, 3, 4, 5 – дни стрессорного воздействия (ежедневное 6-часовое ограничение подвижности). * – данные отличаются от контроля ($p < 0.01$). # – данные отличаются от группы 18-месячных стрессированных крыс в соответствующем временном периоде ($p < 0.01$). IL-1 β – interleukin 1 beta, TNF- α – tumor necrosis factor alpha, TGF- β 1 – transforming growth factor beta 1, IL-10 – interleukin 10, PGC-1 α – peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha, SUCNR1 – succinate receptor 1, VEGF – vascular endothelial growth factor.

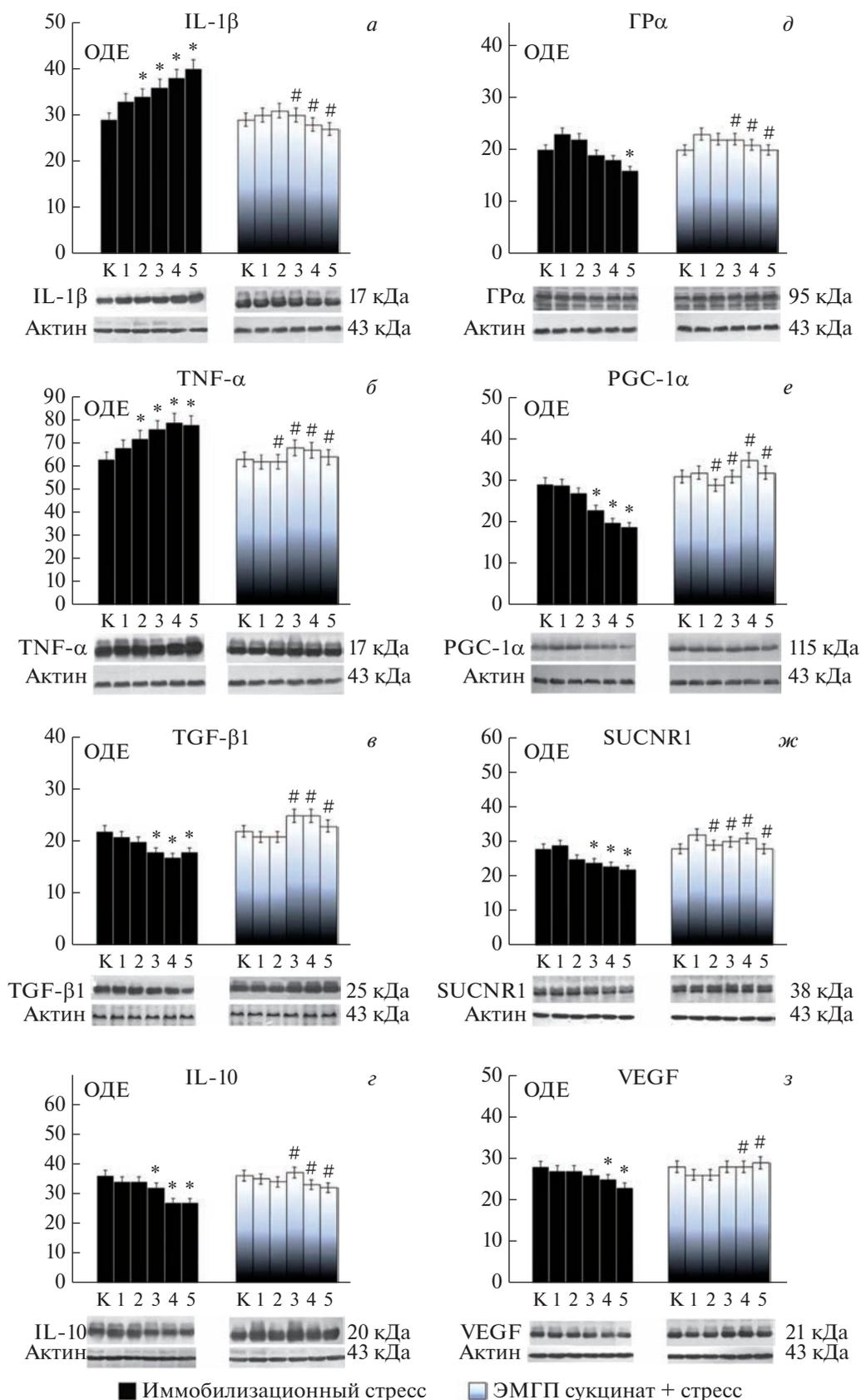


Рис. 2. Схема механизмов развития стресс-индуцированного нейровоспаления и противовоспалительной активности янтарной кислоты. В развитии воспалительной стресс-индуцированной поляризации микроглии ключевую роль играют микроглиальные глутаматные ионотропные NMDA-рецепторы, экспрессия и активность которых положительно регулируется глюкокортикоидными и β -адренорецепторами, экспрессируемыми микроглией. Продукция сукцината митохондриями (восстановительный/обращенный цикл Кребса) увеличивается в условиях стресса и сопряженной гипоксии, вызванной высоким потреблением кислорода активированными нейронами и микроглией. Сукцинат, активируя специфичный рецептор SUCNR1/GPR91 через $G\alpha_q$ -зависимые механизмы, инициирует PGC-1 α -зависимую противовоспалительную поляризацию микроглии. Последовательное двухэтапное восстановление сукцината до γ -оксимасляной кислоты (ГОМК) и ГОМК-зависимая активация ГАМК(B)-рецепторов нейронов и микроглии вызывает торможение глутаматергической передачи (антиэксайтотоксическое действие) и блокаду глутаматзависимой провоспалительной поляризации микроглии. Сокращения: NE – норэпинефрин, AR – адренорецепторы, Glu – глутамат, NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptor, GC – глюкокортикоиды, GR – глюкокортикоидные рецепторы, АФК – активные формы кислорода, TNF α – tumor necrosis factor α , IL-1 β – interleukin 1 β , COX – cyclooxygenase, iNOS – inducible NO synthase, MMP – matrix metalloproteinases, NOX2 – NADPH oxidase 2, КМ – кальмодулин, CREB – cAMP response element-binding protein, p38 MAPK – mitogen-activated protein kinase, PGC-1 α – peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha, PPAR – peroxisome proliferator-activated receptors, ER/AR – estrogen receptors/androgen receptors, TR – thyroid hormone receptors, ERR α – estrogen related receptor α , NRF1 – nuclear respiratory factor 1, NF κ B – nuclear factor kappa B, ГАМК(B)-рецепторы – рецепторы γ -аминомасляной кислоты B.

палительных факторов транскрипции (NF- κ B, AP1, STAT) [27, 30]. Более того, ЭР и ТР активируют экспрессию гена PGC-1 α – транскрипционного коактиватора, определяющего активность широкого спектра факторов транскрипции противовоспалительного и трофического действия (рецепторы половых и тиреоидных гормонов, ERR α , PPAR α , PPAR γ), в то время как ГР вызывают супрессию гена PGC-1 α [4, 8, 30].

В условиях возрастного ГК/ГР-зависимого подавления активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной осей механизмы антиглюкокортикоидной и антиглутаматной защиты ослабевают, что предопределяет прогрессию стерильного системного и нейровоспаления в стареющем организме [38]. В этой связи стимуляция сукцинат/SUCNR1-сигнализации, активация G_q -белка и внутриклеточных сигнальных путей противовоспалительной поляризации микроглии [14], сопряженных с положительной регуляцией PGC-1 α , как было показано в представленном исследовании, может служить действенным подходом увеличения репаративного и трофического потенциала микроглии. Важно отметить, что сукцинат/SUCNR1-сигнализация является ключевой системой активации церебрального ангиогенеза в условиях гипоксии [16] и, таким образом, ограничивает гипоксическую провоспалительную поляризацию микроглии. Противовоспалительные эффекты сукцината могут быть не связаны с SUCNR1 [15]. В условиях стресса и сопряженной гипоксии вследствие гиперактивации нейронов и микроглии сукцинат через стадию восстановления до янтарного полуальдегида является предшественником γ -гидроксимасляной кислоты (ГОМК), которая активирует ГАМК(B)-рецепторы, вызывает индукцию K^+ -проводимости в микроглии и ослабляет глутамат-индуцированную воспалительную микроглиальную активацию. ГОМК, воздействуя на пресинаптические ГАМК(B)-рецепторы, подавляет глутамат-опосредованные

синаптические ответы (антиэксайтотоксическое действие) [39] (рис. 2).

Таким образом, сукцинат вовлекается в механизмы стресс-сигнализации, оказывает SUCNR1-опосредованные и SUCNR-независимые иммуномодулирующие эффекты, ограничивая стресс-индуцированное нейровоспаление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический стресс вызывает воспалительные-дегенеративные изменения в лимбических структурах головного мозга, провоцирует тяжелую нейродисфункцию в старческом возрасте и прогрессию нейродегенеративных патологий. Представленная работа впервые продемонстрировала вовлеченность сукцинат/SUCNR-сигнализации в ограничение стресс-индуцированного нейровоспаления в КГМ старых крыс. Стимуляция сукцинат/SUCNR1-сигнализации является перспективным подходом к коррекции стресс-индуцированной и возраст-ассоциированной гиперактивации ГГН-оси как центрального механизма в развитии хронического асептического нейровоспаления.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franceschi C., Campisi J. 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69** (S1), S4–S9.
2. Thompson M.E., Fox S.A., Berghanel A., Sabbi K.H., Phillips-Garcia S., Enigk D.K., Otali E., Machanda Z.P., Wrangham R.W., Muller M.N. 2020. Wild chimpan-

- zees exhibit humanlike aging of glucocorticoid regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117** (15), 8424–8430.
3. Canet G., Chevallier N., Zussy C., Desrumaux C., Givalois L. 2018. Central role of glucocorticoid receptors in Alzheimer's disease and depression. *Front. Neurosci.* **12**, 739.
 4. Choi G.E., Han H.J. 2021. Glucocorticoid impairs mitochondrial quality control in neurons. *Neurobiol. Dis.* **152**, 105301.
 5. Logie J.J., Ali S., Marshall K.M., Heck M.M.S., Walker B.R., Hadoke P.W.F. 2010. Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration. *PLoS One*. **5** (12), e14476.
 6. Tse Y.C., Bagot R.C., Wong T.P. 2012. Dynamic regulation of NMDAR function in the adult brain by the stress hormone corticosterone. *Front. Cell. Neurosci.* **6** (9), 1–14.
 7. Sugama S., Kakinuma Y. 2020. Stress and brain immunity: microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. *Brain Behav. Immun. Health*. **7**, 100111.
 8. Saito K., Cui H. 2018. Emerging roles of estrogen-related receptors in the brain: Potential interactions with estrogen signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (4), 1091.
 9. Arbo B.D., Schimith L.E., Santos M.G., Hort M.A. 2022. Repositioning and development of new treatments for neurodegenerative diseases: Focus on neuroinflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **919**, 174800.
 10. Grygiel-Gorniak B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications – a review. *Nutr. J.* **13** (1), 17.
 11. Perretti M., Leroy X., Bland E.J., Montero-Melendez T. 2015. Resolution pharmacology: Opportunities for therapeutic innovation in inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **36** (11), 737–755.
 12. Krzak G., Willis C.M., Smith J.A., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. 2021. Succinate receptor 1: An emerging regulator of myeloid cell function in inflammation. *Trends Immunol.* **42** (1), 45–58.
 13. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. 2015. Mitochondria-controlled signalling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front. Neurosci.* **9**, 320.
 14. Trauelsen M., Hiron T.K., Lin D., Petersen J.E., Bretton B., Husted A.S. 2021. Extracellular succinate hyperpolarizes M2 macrophages through SUCNR1/GPR91-mediated Gq signaling. *Cell Rep.* **35** (11), 109246.
 15. Harber K.J., Goede K.E., Verberk S.G.S., Meinster E., Vries H.E., Weeghel M., Winther M.P.J., Bossche J.V. 2020. Succinate is an inflammation-induced immunoregulatory metabolite in macrophages. *Metabolites*. **10** (9), 372.
 16. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.C., Noueihed B., Zhou T., Nadeau-Vallee M., Hou X., Lavoie J.C., Mitchell G., Mamer O.A., Chemtob S. 2014. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34** (2), 285–293.
 17. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. 2020. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова*. **120** (1), 62–69.
 18. Cherif H., Duhamel F., Cecyre B., Bouchard A., Quintal A., Chemtob S., Bouchard J.F. 2018. Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth. *PLoS Biol.* **16** (5), e2003619.
 19. Jin Y., Zhang S.S. 1980. The inhibitory effect of succinic acid on the central nervous system. *Yao Xue Xue Bao*. **15** (12), 761–763.
 20. Yue W., Liu Y.X., Zang D.L., Zhou M., Zhang F., Wang L. 2002. Inhibitory effects of succinic acid on chemical kindling and amygdala electrical kindling in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **23** (9), 847–850.
 21. Chen S.W., Xin Q., Kong W.X., Min L., Li J.F. 2003. Anxiolytic-like effect of succinic acid in mice. *Life Sci.* **73** (25), 3257–3264.
 22. Kirova Y.I., Shakova F.M., Voronina T.A. 2021. Ethylmethylhydroxypyridine succinate induces anti-inflammatory polarization of microglia in the brain of aging rat. *Biochem. Cell Biol.* **15** (4), 356–364.
 23. Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. 2022. Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината. *Пат. физиол. и эксп. тер.* **66** (1), 4–16.
 24. Atrooz F., Alkadhi K.A., Salim S. 2021. Understanding stress: Insights from rodent models. *Curr. Res. Neurobiol.* **2**, 100013.
 25. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J., Schulz R. 2015. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX*. **2**, 440–445.
 26. Niraula A., Sheridan J.F., Godbout J.P. 2017. Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology*. **42** (1), 318–333.
 27. Bereshchenko O., Bruscoli S., Riccardi C. 2018. Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front. Immunol.* **9**, 1332.
 28. Madalena K.M., Lerch J.K. 2017. The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity. *Neural. Plast.* **2017**, 8640970.
 29. Eisele P.S., Salatino S., Sobek J., Hottiger M.O., Handschin C. 2013. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **288** (4), 2246–2260.
 30. Singh B.K., Sinha R.A., Tripathi M., Mendoza A., Ohba K., Sy J.A.C., Xie S.Y., Zhou J., Ho J.P., Chang C.Y., Wu Y., Giguère V., Bay B.H., Vanacker J.M., Ghosh S., Gauthier K., Hollenberg A.N., McDonnell D.P., Yen P.M. 2018. Thyroid hormone receptor and ERR α coordinately regulate mitochondrial fission, mitophagy, biogenesis, and function. *Sci. Signal.* **11** (536), eaam5855.
 31. Rius-Perez S., Torres-Cuevas I., Millan I., Ortega A.L., Perez S. 2020. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1452696.
 32. Chen T.T., Maevsky E.I., Uchitel M.L. 2015. Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: The

- central and peripheral roles of succinate. *Front. Endocrinol.* **6**, 7.
33. Abe N., Nishihara T., Yorozyua T., Tanaka J. 2020. Microglia and macrophages in the pathological central and peripheral nervous systems. *Cells.* **9** (9), 2132.
 34. Daskalakis N.P., Meijer O.C., Kloet E.R. 2022. Mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor work alone and together in cell-type-specific manner: Implications for resilience prediction and targeted therapy. *Neurobiol. Stress.* **18**, 100455.
 35. Nicola A.F., Meyer M., Guennoun R., Schumacher M., Hunt H., Belanoff J., Kloet E.R., Deniselle M.C.G. 2020. Insights into the therapeutic potential of glucocorticoid receptor modulators for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (6), 2137.
 36. Bao A.M., Fischer D.F., Wu Y.H., Hol E.M., Balesar R., Unmehopa U.A., Zhou J.N., Swaab D.F. 2006. A direct androgenic involvement in the expression of human corticotropin-releasing hormone. *Mol. Psychiatry.* **11** (6), 567–576.
 37. Bianchi V.E., Rizzi L., Bresciani E., Omeljaniuk R., Torsello A. 2020. Androgen therapy in neurodegenerative diseases. *J. Endocr. Soc.* **4** (11), bvaa120.
 38. Dostert A., Heinzl T. 2004. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* **10** (23), 2807–2816.
 39. Kamal R.M., Noorden M.S., Franzek E., Dijkstra B.A.G., Loonen A.J.M., De Jong C.A.J. 2016. The Neurobiological mechanisms of gamma-hydroxybutyrate dependence and withdrawal and their clinical relevance: A review. *Neuropsychobiology.* **73** (2), 65–80.

Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Limits Stress-Induced Neuroinflammation in the Cerebral Cortex of Old Rats

O. L. Terekhina¹, Y. I. Kirova¹, *

¹Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

*e-mail: bioenerg@mail.ru

In the aging and the development of age-associated diseases, the trigger mechanism is the hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal neuroendocrine axis, hypersecretion of glucocorticoids, which, under excessive and long-term stimulation, have inflammatory and degenerative effects. Chronic stress exacerbates glucocorticoid-dependent atrophic changes in the aging brain, increases neuroinflammation and neurological dysfunction, and is a key risk factor for Alzheimer's disease. In the correction of aseptic neuroinflammation in elderly and senile patients, the use of anti-inflammatory agents that exhibit anti-glucocorticoid (pro-anabolic) and anti-glutamate (anti-excitotoxic) effects is pathogenetically justified. Succinate/SUCNR1 signalling is involved in the development of immunomodulatory, trophic, and antihypoxic effects; however, its role in the mechanisms of the stress response remains unexplored. The aim of this study was to assay the impact of succinate/SUCNR1 signalling on the development of stress-induced neuroinflammation in the cerebral cortex of old rats. The work was performed on outbred albino male rats at the age of 18 months. Chronic restraint stress was modelled by immobilizing animals in individual plastic cases for 6 h daily for 5 days. Mexidol (2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (EMHP) succinate) was used as a form of succinate that crosses the blood-brain barrier. Mexidol was administered intraperitoneally to old rats at a dose of 100 mg/kg daily for 5 days 15 min before the onset of stress. The levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α), anti-inflammatory cytokines (TGF- β 1, IL-10), glucocorticoid receptors (GR α), transcriptional coactivator PGC-1 α , succinate receptor SUCNR1/GPR91, and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined by immunoblotting in cerebral cortex (CC) samples. It was shown that chronic immobilization stress caused an increase in the level of IL-1 β and TNF- α during stress, which was accompanied by a decrease in the content of anti-inflammatory cytokines, SUCNR1, GR α , PGC-1 α . The course administration of EMHP succinate limited the development of stress-induced neuroinflammation in the CC of old rats and prevented a decrease in the levels of SUCNR1, IL-10, TGF- β 1, PGC-1 α , and GR α . The study reveals for the first time the stress-protective potential of succinate/SUCNR1 signalling in the brain of old rats associated with the activation of PGC-1 α -dependent anti-inflammatory mechanisms under conditions of chronic stress.

Keywords: aging, neuroinflammation, stress, succinate, SUCNR1, rats

УДК 612.74:57.085.2

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА УГНЕТАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ МИОТРУБОК В КУЛЬТУРЕ

© 2023 г. А. Р. Токмакова^а, Г. В. Сибгатуллина^а, К. Р. Гилицдинава^б, А. И. Маломуж^{а, в, *}

^а Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Казань, 420111 Россия

^б Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^в Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева – КАИ, Казань, 420111 Россия

*e-mail: artur57@list.ru

Поступила в редакцию 16.04.2023 г.

После доработки 20.05.2023 г.

Принята к публикации 24.05.2023 г.

Гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) принято рассматривать как сигнальную молекулу в синапсах центральной нервной системы, где она играет роль основного тормозного нейромедиатора в зрелом мозге и участвует в процессе нейrogenеза. Недавно были получены данные, указывающие на то, что ГАМК может участвовать и на ранних этапах процесса развития скелетной мышечной ткани. В настоящем исследовании, выполненном на культуре миоцитов крысы, было проанализировано влияние экзогенной ГАМК на процесс слияния миоцитов в миотрубки (по анализу такого морфометрического показателя как “индекс слияния”). Добавление аминокислоты в культуру приводило к значительному концентрационно-зависимому угнетению (вплоть до полной остановки) процесса образования миотрубок. Из возможных белков, способных опосредовать влияние аминокислоты, рассматривались ГАМК_A рецепторы и транспортеры ГАМК (GAT-2). Методами иммуногистохимии были получены доказательства наличия этих белков на культивируемых клетках. Блокада ГАМК_A рецепторов габазином никак не сказывалась на индексе слияния, и ГАМК в его присутствии продолжала оказывать свое угнетающее действие. Ингибирование ГАМК транспортеров никотинотропной кислотой само по себе снижало индекс слияния миоцитов, однако на фоне действия блокатора транспортеров собственный эффект ГАМК уже отсутствовал. Полученные данные согласуются с высказанной гипотезой об участии аминокислоты ГАМК на ранних этапах развития скелетной мускулатуры и предполагают, что угнетающий эффект экзогенной аминокислоты может быть обусловлен увеличением ее концентрации в саркоплазме, поскольку и добавление блокатора ГАМК транспортеров и повышение внеклеточной концентрации ГАМК негативно сказываются на образовании миотрубок.

Ключевые слова: миогенез, миоцит, миотрубка, ГАМК

DOI: 10.31857/S0233475523050134, **EDN:** OMGNGS

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процессов миогенеза и сигнальных путей его регуляции имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку это позволяет понять причины возникновения ряда заболеваний, связанных с изменениями в мышечном аппарате, и способствует разработке подходов для их лечения. Кроме того, эти знания создают фундамент для направленных исследований в области тканевой инженерии и регенеративной клеточной терапии для лечения атрофии мышц различного генеза и восстановления скелетной мышцы вследствие травматического повреждения.

Процесс образования любой скелетной мышцы из клеток предшественников – миобластов, достаточно сложный, и в нем выделяют несколько стадий, среди которых одной из ключевых является стадия слияния миоцитов в миотрубки (незрелые мышечные волокна) [1].

К настоящему моменту установлен целый ряд генов и сигнальных каскадов, управляющих процессами слияния мышечных клеток в миотрубки [2]. Относительно недавно были получены экспериментальные свидетельства, указывающие на то, что в процессе миогенеза у млекопитающих может участвовать и такая сигнальная молекула как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), ко-

тору ранее рассматривали исключительно в качестве одного из основных нейромедиаторов центральной нервной системы [3]. Молекулы этой аминокислоты обнаруживаются в цитоплазме как развивающихся миоцитов, так и в образуемых миотрубках. По мере созревания мышечного волокна количество ГАМК снижается, и в зрелых волокнах она не обнаруживается [4]. Это и позволило предположить участие данной аминокислоты на ранних стадиях миогенеза. В пользу данного предположения свидетельствуют экспериментальные данные, демонстрирующие угнетение процесса слияния миоцитов при повышении внеклеточной концентрации ГАМК [5]. Однако каков механизм этого влияния аминокислоты, и какие белки могут опосредовать данный процесс, оставалось до сих пор не выясненным, что и стало целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на культуре миоцитов, выделенных из икроножной мышцы 3-дневных крыс, согласно протоколу [6]. Процесс образования миотрубок в культуре оценивался по подсчету “индекса слияния”, который определяется как соотношение числа ядер в миотрубках к общему числу ядер в поле зрения [7]. Для визуализации ядер препараты окрашивали 2% раствором орсеина (Fluka, Испания). При подсчете индекса слияния оценивали не менее 20 полей зрения на каждом препарате.

Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов проводили по методике, описанной нами ранее [4]. Наличие в мембранах культивируемых клеток белков-кандидатов, способных опосредовать влияние внеклеточной ГАМК (ГАМК_A рецепторы и ГАМК транспортеры), оценивали с помощью соответствующих специфических антител: для рецепторов – GABA_A (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, США), для транспортеров – GAT-2 (1 : 200, Alamone Labs, Израиль). Было проанализировано не менее 500 клеток в каждом образце для каждой из 3 индивидуально полученных клеточных культур.

Добавление в культуру фармакологических препаратов осуществлялось однократно на 3-и сут культивирования, оценку параметров проводили через 24 ч после внесения препаратов. В исследовании использовали: ГАМК (1–100 мМ, Sigma-Aldrich, США), антагонист ионотропных ГАМК_A рецепторов габазин (10 мМ, Sigma-Aldrich) и блокатор ГАМК транспортеров нипекотиковую кислоту (10 мМ, Sigma-Aldrich).

В экспериментах было проанализировано 12 индивидуально полученных культур миоцитов и для каждой серии было использовано от 3 до 6 препаратов. В каждом эксперименте с культурой имелся

свой контроль (культура без внесения фармакологических препаратов), при этом достоверной разницы между контрольными значениями обнаружено не было.

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий оценивали с помощью ANOVA. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате культивирования высеванных миоцитов первые миотрубки, которые идентифицировались как клеточные элементы, содержащие 3 и более ядер, выявлялись уже на 3-и сут. На 4-е сут в культуре идентифицировалось значительное количество образованных миотрубок, которые имели в среднем по 6 ядер. Индекс слияния составил 0.15, т.е. 15% ядер от всей популяции культивируемых клеток находилось в составе миотрубок.

При добавлении в среду ГАМК в концентрации 1 мМ наблюдалось снижение индекса слияния на 27% ($p < 0.05$, рис. 1). При этом миотрубки содержали в среднем по 7 ядер.

При повышении концентрации аминокислоты до 10 мМ имело место более выраженное снижение индекса слияния, величина которого уменьшалась на 47% ($p < 0.05$, рис. 1). Среднее значение количества ядер составляло 6 и не отличалось от контроля ($p > 0.05$). Однако было отмечено, что, если в контрольных культурах и культурах с добавлением 1 мМ ГАМК обнаруживались миотрубки, содержащие более 20 ядер, то в случае с 10 мМ таких клеточных элементов обнаружено не было.

Дальнейшее повышение концентрации экзогенно добавляемой аминокислоты до 100 мМ привело к выраженному угнетающему эффекту на процесс образования миотрубок. Индекс слияния по сравнению с контролем снизился на 73% ($p < 0.05$, рис. 1). При этом в культуре обнаруживались редкие миотрубки, содержащие максимум 3 ядра.

Таким образом, увеличение концентрации непротеиногенной аминокислоты ГАМК угнетает процесс слияния миоцитов в культуре. При этом снижается не только количество образуемых миотрубок, но и общее количество ядер в них. Эти результаты полностью подтверждают недавно полученные нами данные о негативном влиянии экзогенной аминокислоты на процесс миогенеза [5].

На основании того, что ГАМК присутствует в саркоплазме как миоцитов, так и в образующихся миотрубках, и в развивающихся мышечных волокнах [4], были сделаны следующие предположения: (i) ГАМК играет некую межклеточную сигнальную функцию, которая влияет на процесс

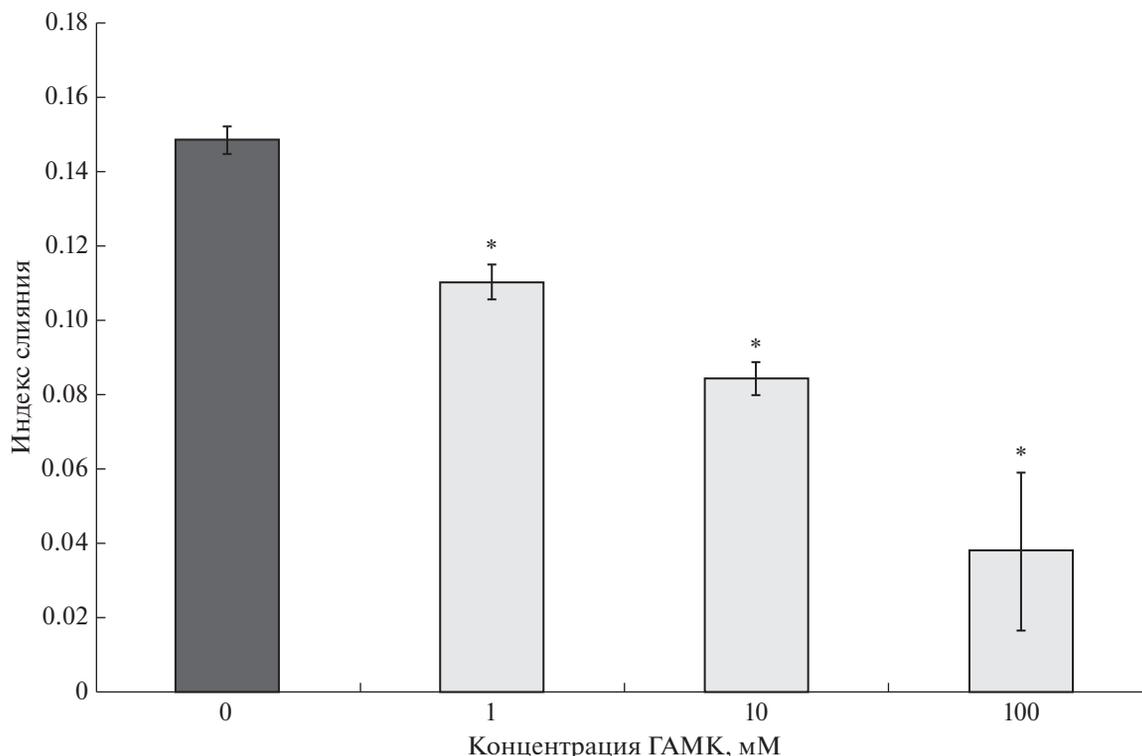


Рис. 1. Угнетающее влияние ГАМК на процесс образования миотрубок из миоцитов крыс: изменения индекса слияния миоцитов на 4-е сут культивирования после 24 ч аппликации различных концентраций аминокислоты. Темно-серый столбик – значение индекса слияния в контрольной группе. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

развития мышечной ткани; (ii) ГАМК тем или иным образом участвует в клеточном метаболизме, сопровождающим процесс миогенеза. Проверка этих предположений и легла в основу дальнейших этапов настоящего исследования, в котором ГАМК использовали в концентрации 10 мМ.

Сигнальная функция ГАМК опосредуется как рецепторами, так и транспортерами [8, 9]. Поскольку на культуре миоцитов *Xenopus* были выявлены ионотропные функциональные ГАМК_A рецепторы, а в нервно-мышечном синапсе крысы обнаружены транспортеры ГАМК GAT-2 [10, 11], то именно на них и решено было сосредоточить внимание в нашем исследовании.

Иммуногистохимическое окрашивание культуры миоцитов на ГАМК_A рецепторы не выявило наличия этих рецепторов на миоцитах. В то же время на поверхности образуемых в культуре миотрубок наблюдалось специфическое окрашивание (рис. 2), свидетельствующее о том, что миотрубки млекопитающих экспрессируют ГАМК_A рецепторы.

При иммуногистохимическом окрашивании культуры на транспортер ГАМК (GAT-2) были получены следующие данные. На 1-е сут иммуноположительную реакцию к антителам имели еди-

ничные миоциты. На 2-е сут их количество увеличивалось. На 3-и сут флуоресцентный сигнал исходил как от миоцитов, так и от миотрубок, демонстрируя достаточно яркую специфическую окраску (рис. 2).

Следовательно, в культуре миоцитов крысы клетки экспрессируют оба мембранных белка ГАМКергической сигнализации, способных опосредовать действие экзогенно добавляемой ГАМК.

Возможность участия ГАМК_A рецепторов в угнетающем влиянии аминокислоты на процесс образования миотрубок оценивали с помощью аппликации блокатора этого типа рецепторов габазина [12]. Добавление только данного антагониста в концентрации 10 мМ не оказало никакого влияния на индекс слияния миоцитов, а в присутствии габазина ГАМК продолжала оказывать свое угнетающее влияние на образование миотрубок в полном объеме и индекс слияния снизился на 50% (рис. 3). Следовательно, механизм ингибирующего действия ГАМК на процесс образования миотрубок никак не затрагивает ионотропные ГАМК_A рецепторы, экспрессирующиеся на саркомере развивающихся мышечных волокон.

Для оценки роли транспортеров ГАМК в механизме угнетающего миогенез эффекта экзоген-

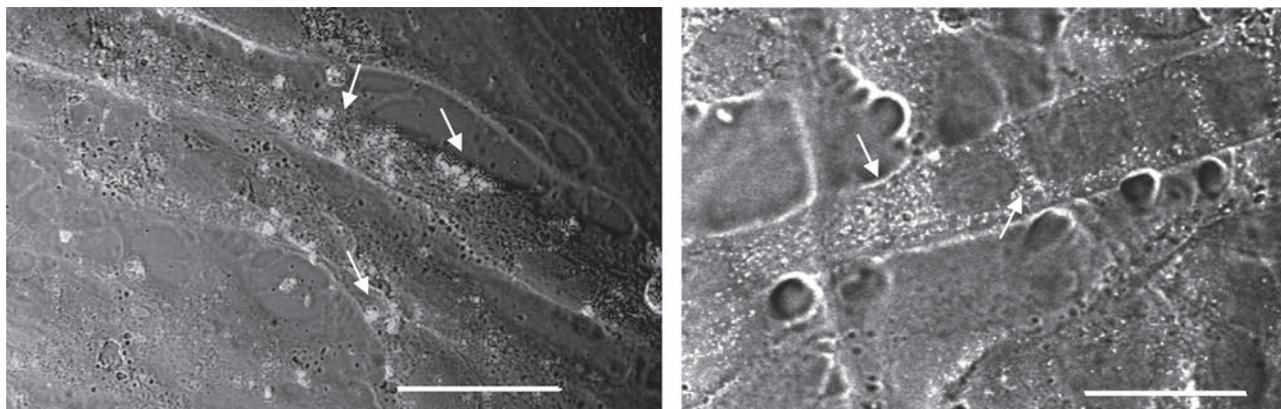


Рис. 2. Иммунопозитивное окрашивание культуры миоцитов и образуемых миотрубок на наличие ГАМК_A рецепторов (слева) и транспортеров ГАМК GAT-2 (справа). Масштаб – 25 мкм. Стрелками указаны примеры паттернов иммунопозитивного окрашивания (светлые участки).

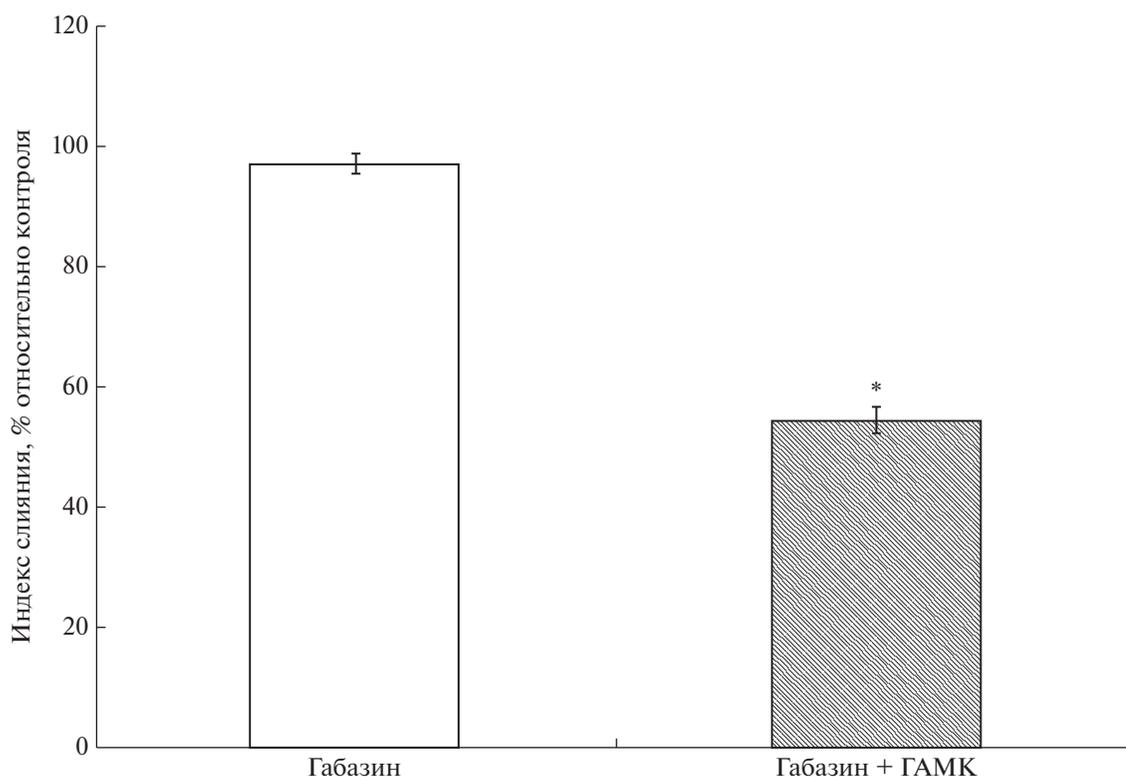


Рис. 3. Отсутствие эффекта блокатора ГАМК_A рецепторов габазина (10 мМ) на индекс слияния миоцитов и наличие угнетающего миогенез действия ГАМК (10 мМ) в присутствии блокатора рецепторов. Изменения индекса слияния миоцитов выражены в % от контрольного значения для образцов без внесения фармакологических агентов, принятого за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ной аминокислоты использовали ингибитор этих белков – нипекотиковую кислоту [13]. Аппликация этого фармакологического агента в концентрации 10 мМ привело к снижению индекса слияния на 43% от контроля ($p < 0.05$). В то же время ГАМК в присутствии нипекотиковой кислоты полностью теряла способность оказывать угнета-

ющее влияние на миогенез, и значение индекса слияния при совместной аппликации аминокислоты и блокатора не отличалось от значения, полученного только в присутствии нипекотиковой кислоты (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в исследуемой культуре присутствуют и функ-

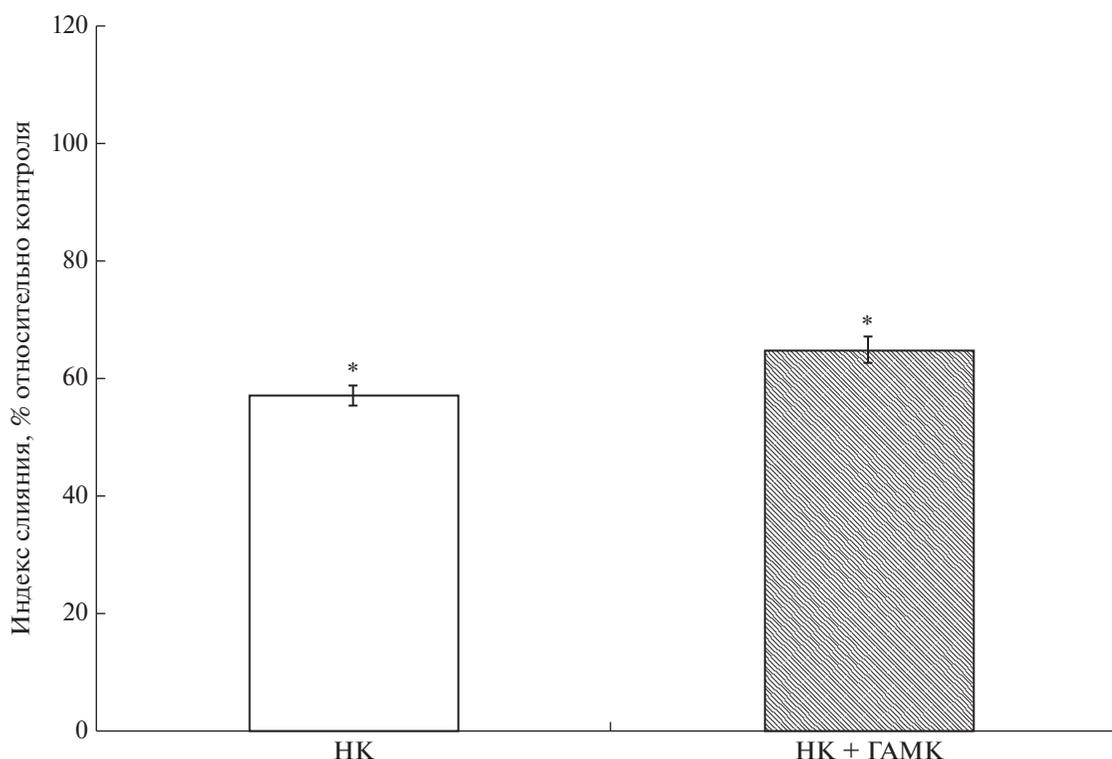


Рис. 4. Угнетающий эффект блокатора ГАМК транспортеров никотиновой кислоты (НК, 10 мМ) на процесс образования миотрубок и отсутствие влияния ГАМК (10 мМ) при совместной аппликации с этим блокатором (НК + ГАМК). Изменения индекса слияния миоцитов выражены в % от контрольного значения для образцов без внесения фармакологических агентов, принятого за 100%. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ционируют ГАМК транспортеры (как минимум, GAT-2), и их инактивация приводит к ингибированию образования миотрубок.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании на культуре миоцитов млекопитающего получены следующие основные результаты. Во-первых, увеличением концентрации экзогенной ГАМК можно добиться практически полного ингибирования процесса слияния миоцитов в миотрубки. Во-вторых, блокада ГАМК_A рецепторов никак не отражается на процессе слияния миоцитов и не влияет на развитие угнетающего эффекта внеклеточной ГАМК. В-третьих, блокада ГАМК транспортеров миоцитов негативно сказывается на образовании миотрубок в культуре, однако на фоне инактивации этих мембранных белков устраняется собственный угнетающий эффект ГАМК.

Физиологическое действие на клетку экстраклеточной ГАМК в большинстве своем опосредуется активацией специфических рецепторов к этой аминокислоте: ионотропных ГАМК_A и метаботропных ГАМК_B рецепторов [14, 15]. Относительно недавно особняком выделяли также ионо-

тропные ГАМК_C рецепторы, однако в настоящее время эти белки принято обозначать как ГАМК_ρ рецепторы и относить их к группе ГАМК_A (ГАМК_{A-ρ}) [15, 16]. Доказано непосредственное участие рецепторов ГАМК в регуляции миграции и пролиферации как нейрональных [17], так и нейрональных клеток [18]. В нашем случае мы получили доказательства отсутствия участия ГАМК_A рецепторов в механизме реализации эффекта экзогенного ГАМК на миогенез. Возможно, что рецепторы ГАМК_B или ГАМК_{A-ρ} (наличие которых на миоцитах и миотрубках, в отличие от ГАМК_A рецепторов, еще не подтверждено) могли бы опосредовать воздействие экзогенной ГАМК, однако это маловероятно, поскольку эффект ГАМК полностью отсутствовал на фоне блокатора ГАМК транспортеров.

Выявленный нами факт снижения индекса слияния миоцитов при ингибировании ГАМК транспортеров и отсутствие на этом фоне эффекта экзогенно апплицируемой ГАМК позволяет предположить значительную роль именно внутриклеточной ГАМК. Согласно классическим представлениям о ГАМКергической сигнализации в нервной системе, функционирование транспортеров аминокислоты направлено на удаление ГАМК из

внутриклеточного пространства [19, 20]. Однако в условиях отсутствия синапса функционирование ГАМКергической системы может кардинально изменяться. Установлено, что в развивающихся нейронах ГАМК_A рецепторы, которые способны пропускать ионы хлора, вызывают не гиперполяризацию, как в зрелых нейронах, а наоборот, деполяризацию [21]. О возможности реверсивной работы ГАМК транспортеров, при которой имеет место выкачивание молекул аминокислоты из клетки во внеклеточное пространство известно достаточно давно [22] и этот феномен уже подтвержден многократно не только в развивающихся, но и в зрелых клетках [23–25], и в частности, для транспортеров GAT-2/3 типа [20, 26]. Оказалось, что различные подтипы транспортеров могут проявлять разные “реверсивные профили” [27].

Одним из объяснений того, что и ингибирование ГАМК транспортеров, и увеличение экстраклеточной концентрации ГАМК приводит к угнетению процесса слияния миоцитов, может быть увеличение внутриклеточного содержания аминокислоты. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные о том, что транспортер ГАМК обычно работает при некотором “равновесии” в концентрации аминокислоты по обе стороны мембраны, и его (транспортер) можно легко запустить работать в обратном направлении путем увеличения цитозольной ГАМК [25]. Однако, каково в действительности направление переноса ГАМК через ГАМК транспортеры в культуре миоцитов в норме и при повышенной концентрации аминокислоты в экстраклеточной среде, пока остается неизвестным. Ответ на этот вопрос может быть получен в дальнейшем при оценке внутриклеточного уровня ГАМК в условиях ингибирования транспортеров и аппликации в культуру экзогенной ГАМК.

Таким образом, в настоящем исследовании были получены результаты, подтверждающие ранее высказанное предположение об участии ГАМК в ранних этапах развития скелетной мускулатуры [4, 5]. Механизм угнетающего влияния аминокислоты на процесс образования миотрубок реализуется при участии трансмембранных транспортеров ГАМК.

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

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН (122011800137-0) с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Соответствие принципам этики. Все эксперименты проведены в строгом соответствии с международными биоэтическими нормами и одобре-

ны комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол № 22/6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abmayr S.M., Pavlath G.K. 2012. Myoblast fusion: Lessons from flies and mice. *Development*. **139** (4), 641–656. <https://doi.org/10.1242/dev.068353>
2. Murphy M., Kardon G. 2011. Origin of vertebrate limb muscle: The role of progenitor and myoblast populations. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00001-2>
3. Watanabe M., Maemura K., Kanbara K., Tamayama T., Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* **213**, 1–47. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)
4. Sibgatullina G.V., Malomouzh A.I. 2020. GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. *Protoplasma*. **257** (3), 1009–1015. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
5. Sibgatullina G., Al Ebrahim R., Gilizhdinova K., Tokmakova A., Malomouzh A. 2023. Differentiation of myoblasts in culture: Focus on serum and GABA. *Cells Tissues Organs*. (In press). <https://doi.org/10.1159/000529839>
6. Das M., Rumsey J.W., Bhargava N., Stancescu M., Hickman J.J. 2010. A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. *Biomaterials*. **31** (18), 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.055>
7. Baccam A., Benoni-Sviercovich A., Rocchi M., Moresi V., Seelaender M., Li Z., Adamo S., Xue Z., Coletti D. 2019. The mechanical stimulation of myotubes counteracts the effects of tumor-derived factors through the modulation of the activin/follistatin ratio. *Front. Physiol.* **10**: 401. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00401>
8. Wu C., Sun D. 2015. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab. Brain. Dis.* **30** (2), 367–379. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9560-1>
9. Zhou Y., Danbolt N.C. 2013. GABA and glutamate transporters in brain. *Front. Endocrinol (Lausanne)*. **4**, 165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>
10. Borodinsky L.N., Spitzer N.C. 2007. Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104** (1), 335–340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607450104>
11. Nurullin L.F., Nikolsky E.E., Malomouzh A.I. 2018. Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. *Acta. Histochem.* **120** (3), 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.003>
12. Bai D., Zhu G., Pennefather P., Jackson M.F., MacDonald J.F., Orser B.A. 2001. Distinct functional and

- pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* **59** (4), 814–824.
<https://doi.org/10.1124/mol.59.4.814>
13. Moldavan M., Cravetchi O., Allen C.N. 2017. GABA transporters regulate tonic and synaptic GABA_A receptor-mediated currents in the suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* **118** (6), 3092–3106.
<https://doi.org/10.1152/jn.00194.2017>
 14. Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: Structure and function. *Pharmacol. Rev.* **54**, 247–264.
<https://doi.org/10.1124/pr.54.2.247>
 15. Olsen R.W., Sieghart W., 2008. International union of pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* **60**, 243–260.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
 16. Naffaa M.M., Hung S., Chebib M., Johnston G.A.R., Hanrahan J.R., 2017. GABA-ρ receptors: Distinctive functions and molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **174** (13), 1881–1894.
<https://doi.org/10.1111/bph.13768>
 17. Behar T.N., Schaffner A.E., Scott C.A., Greene C.L., Barker J.L., 2000. GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex.* **10**, 899–909.
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.9.899>
 18. Kleinrok Z., Matuszek M., Jesipowicz J., Matuszek B., Opolski A., Radzikowski C., 1998. GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J. Physiol. Pharmacol.* **49**, 303–310.
 19. Moss F.J., Imoukhuede P.I., Scott K., Hu J., Jankowsky J.L., Quick M.W., Lester H.A., 2009. GABA transporter function, oligomerization state, and anchoring: Correlates with subcellularly resolved FRET. *J. Gen. Physiol.* **134** (6), 489–521.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910314>
 20. Kardos J., Dobolyi Á., Szabó Z., Simon Á., Lourmet G., Palkovits M., Héja L. 2019. Molecular plasticity of the nucleus accumbens revisited—astrocytic waves shall rise. *Mol. Neurobiol.* **56**, 7950–7965.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1641-z>
 21. Ben-Ari Y., Khalilov I., Kahle K.T., Cherubini E., 2012. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist.* **18** (5), 467–486.
<https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
 22. Attwell D., Barbour B., Szatkowski M., 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron.* **11** (3), 401–407.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90145-h](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90145-h)
 23. Levi G., Raiteri M., 1993. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.* **16** (10), 415–419.
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90010-j](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90010-j)
 24. Pin J.P., Bockaert J., 1989. Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J. Neurosci.* **9** (2), 648–656.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-02-00648.1989>
 25. Wu Y., Wang W., Richerson G.B. 2001. GABA transaminase inhibition induces spontaneous and enhances depolarization-evoked GABA efflux via reversal of the GABA transporter. *J. Neurosci.* **21** (8), 2630–2639.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02630.2001>
 26. Héja L., Simon Á., Szabó Z., Kardos J. 2019. Feedback adaptation of synaptic excitability via Glu: Na⁺ symport driven astrocytic GABA and Gln release. *Neuropharmacology.* **161**, 107629.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.006>
 27. Conti F., Minelli A., Melone M., 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: Localization, development and pathological implications. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **45** (3), 196–212.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.003>

The Study of the Mechanism of Gamma-Aminobutyric Acid Inhibitory Effect on the Myotube Formation Process in Cell Culture

A. R. Tokmakova¹, G. V. Sibgatullina¹, K. R. Gilizhdinova², A. I. Malomouzh^{1, 3, *}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

²Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

³Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev (KAI), Kazan, 420111 Russia

*e-mail: artur57@list.ru

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is commonly regarded as a signaling molecule in CNS synapses, where it plays the role of the main inhibitory neurotransmitter in the mature brain and is involved in the process of neurogenesis. Recently, data have been obtained indicating that GABA can also be involved in the early stages of the skeletal muscle development process. In the present study performed on rat cultured myocytes, we analyzed the effect of exogenous GABA on the process of myocyte fusion into myotubes as assessed by the

morphometric parameter “fusion index”. Addition of GABA to the cell culture resulted in a significant concentration-dependent inhibition, up to complete cessation, of myotube formation. Of possible proteins that can mediate this effect, GABA_A receptors and GABA transporters (GAT-2) have been considered. Evidence of the presence of these proteins on cultured cells was obtained by immunohistochemistry methods. The blockade of GABA_A receptors by gabazine had no effect on the fusion index, and GABA exerted its inhibitory effect in the presence of gabazine. Inhibition of GABA transporters by nipecotic acid, in itself, reduced the myocyte fusion index; however, there was no effect of GABA in the presence of this blocker of GABA transporters. The data obtained are consistent with the hypothesis about the participation of GABA in the early stages of skeletal muscle development. Results suggest that the inhibitory effect of exogenous GABA may be due to an increase in its concentration in the sarcoplasm, since both the addition of a GABA transporter inhibitor and an increase in the extracellular concentration of GABA inhibited the formation of myotubes.

Keywords: myogenesis, myocyte, myotube, GABA

УДК 576.31

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ Ca^{2+} -НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ $i\text{PLA}2$ В ИНДУКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫМИ АЦИЛКАРНИТИНАМИ

© 2023 г. Н. И. Федотчева^а, Е. В. Гришина^а, В. В. Дынник^{а, *}

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

*e-mail: dynnik@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.04.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Известно, что наиболее токсичными считаются активированные производные длинноцепочечных жирных кислот ацилкарнитины (LCAC), которые наряду с кальцием могут участвовать в индукции митохондриальной поры, вовлекая различные типы фосфолипаз. В данной работе исследовано влияние ингибиторов Ca^{2+} -независимых и Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз, а также ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы на индукцию поры D,L -пальмитоилкарнитином (PC, C16:0). В экспериментах на изолированных митохондриях печени крыс исследовали влияние PC на скорость дыхания митохондрий, мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) и набухание митохондрий при окислении глутамата и пирувата или сукцината. Показано, что ингибиторы карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 этомоксир 2, Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы $s\text{PLA}2$ аристолоховая кислота или Ca^{2+} -независимой фосфолипазы $i\text{PLA}2\gamma$ бромоенол лактон и PACOCF3 вызывали увеличение критических концентраций D,L -пальмитоилкарнитина (PC*), необходимых для снижения мембранного потенциала и индукции набухания митохондрий. В активированном ADP состоянии ($\text{ADP} + \text{Mg}^{2+}$ +гексокиназа) этомоксир 2 и аристолоховая кислота усиливали ингибирование дыхания и падение потенциала, вызванные избытком PC, в то время как ингибиторы фосфолипазы $i\text{PLA}2\gamma$ PACOCF3 и бромоенол лактон, оказывали выраженный защитный эффект. Ингибирование $i\text{PLA}2\gamma$ препятствовало снижению $\Delta\psi_m$ и ингибированию дыхания митохондрий, вызванных PC. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вовлечении митохондриальной фосфолипазы $i\text{PLA}2\gamma$ в индукцию митохондриальной поры длинноцепочечными ацилкарнитинами.

Ключевые слова: длинноцепочечные ацилкарнитины, митохондриальная пора, ингибиторы фосфолипаз, кальций независимая фосфолипаза $i\text{PLA}2\gamma$

DOI: 10.31857/S0233475523050043, **EDN:** OFGOIA

ВВЕДЕНИЕ

Индукция митохондриальной циклоспорин А (CsA)-зависимой поры (mPTP) считается ключевым фактором гибели клеток различных органов и тканей при ишемии-реперфузии, нейродегенеративных заболеваниях, действии различных токсинов и др. [1–4]. Ионы кальция рассматриваются в качестве основного индуктора этой поры. Однако хорошо известно, что в условиях ишемии-реперфузии концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в очаге поражения клеток могут превышать десятки мкМ [5, 6]. Наиболее токсичными считаются LCAC, активированные производные LCFA, концентрации которых в крови пациентов с ожирением, стеатогепатитом и диабетом 2 типа (T2D), а также при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях могут в 2–4 ра-

за превышать контрольные значения, что увеличивает риск инфаркта/инсульта в несколько раз [7, 8]. Исследования последних лет показывают, что LCAC и соответствующие ацил-КоА (Acyl-CoA) могут накапливаться в постишемических митохондриях в больших концентрациях [9]. Предполагается, что образующиеся в клетках из LCAC длинноцепочечные ацил-КоА являются основными токсинами, вызывающими подавление энергетики митохондрий вследствие ингибирования ключевых NAD-зависимых дегидрогеназ митохондрий и различных транспортеров [10–16] и активации открытия CsA-зависимой поры [3, 8, 14, 16].

Также известно, что LCFA могут вызывать образование кальций-зависимой липидной поры [17–19]. Насыщенные жирные кислоты: миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и эйкозановая (C20:0), имеющие в

сравнении с другими LCFA высокое сродство к Ca^{2+} , могут образовывать в мембранах липидную пору. Образование такой обратимой липидной поры не чувствительно к действию CsA и предотвращается в присутствии EGTA, что свидетельствует о формировании комплексов LCFA и Ca^{2+} [18, 19]. Поэтому можно допустить, что деацилирование пальмитоил-КоА или миристоил-КоА в митохондриях с образованием свободных жирных кислот и Коэнзима А (КоА), может приводить к локальному накоплению соответствующих жирных кислот и индукции Ca^{2+} -зависимой липидной поры.

Наши предыдущие исследования, проведенные на изолированных митохондриях печени крыс, показали, что *D,L*-ацилкарнитины с различной длиной углеродной цепи (от C6:0 до C16:0) могут вызывать ингибирование дыхания митохондрий и индукцию митохондриальной поры. Влияние этих *D,L*-ацилкарнитинов на скорость дыхания митохондрий, набухание и снижение митохондриального потенциала было обратно-пропорционально длине углеродной цепи [20]. Наиболее токсичными оказались *D,L*-миристоилкарнитин (МС) и *D,L*-пальмитоилкарнитин (РС), критические концентрации которых (50–70 мкМ), вызывающие индукцию поры в митохондриях печени и сердца крыс, уменьшались в присутствии кальция в среде, свидетельствуя о синергичном действии LCAC и Ca^{2+} на индукцию поры [20–22]. Однако индукция поры с участием МС и РС в наших экспериментах наблюдалась также в присутствии EGTA, CsA, ADP и Mg^{2+} , наличие которых в среде в 2–3 раза увеличивало критические концентрации LCAC, что свидетельствует об участии LCAC в активации CsA-зависимой поры [20], но не исключает возможное вовлечение других дополнительных механизмов.

В экспериментах, проведенных на изолированных кардиомиоцитах, также было показано [22], что добавки в среду инкубации клеток 15–20 мкМ МС или РС вызвали, после лаг-периода в 8–15 мин, сокращение (контрактуру) и гибель клеток вследствие перераспределения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула в митохондрии, коллапса энергетики и выхода Ca^{2+} из митохондрий. Длительность лаг-периода увеличивалась, а количество погибших клеток уменьшалось в присутствии неорганического фосфата (P_i), CsA, ингибиторов Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII), Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A2 (сPLA2) и фосфолипазы C (PLC) [22].

В настоящее время установлено, что в период после ишемии-реперфузии и при сердечной недостаточности, кроме активации CaMKII δ , сPLA2 α и PLC β , γ , усиливается также ферментативная активность Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A2

(iPLA2 γ), что затрудняет восстановление миокарда и способствует индукции mPTP ионами кальция [23–27]. Однако участие фосфолипазы iPLA2 γ в индукции митохондриальной поры посредством LCAC в настоящее время изучено недостаточно. Поэтому задачей нашей работы было исследование возможного вклада iPLA2 γ в индукцию поры РС в митохондриях печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выделения митохондрий и проведения экспериментов описаны ранее [20]. Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар 6–8 недель содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помещениях при температуре 20–22°C (свет/темнота = 12/12 ч). Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA и 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала 125 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 1 мМ MgCl_2 . Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

Скорость потребления кислорода митохондриями определяли полярографическим методом с помощью закрытого кислородного электрода (Кларка) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при 27°C и постоянном перемешивании. Разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi_m$) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония (TPP^+), концентрацию которого во внешней среде [TPP^+]_{out} регистрировали с помощью TPP^+ -селективного электрода. Среда инкубации содержала 125 мМ KCl, 3 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ MgSO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), 2 мкМ TPP^+ . Стационарную скорость дыхания в состоянии V_3 при добавлении 1 мМ ADP обеспечивали внесением в среду инкубации 5 мМ глюкозы и 0.5 ед. гексокиназы. В работе использовали реактивы Sigma (США), Tocris (Великобритания).

Набухание митохондрий определяли спектральным методом при длине волны 540 нм с использованием спектрофотометра Ocean Optic USB-4000 (США). Митохондрии (0.3–0.4 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 125 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ HEPES (рН 7.4), в каче-

стве субстрата окисления использовали сукцинат (5 мМ).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием *t*-критерия для сравнения пар величин с помощью программы Сигма-Плот 11. Данные представлены как среднее значение S.E.M. $n = 6$ независимых экспериментов. За уровень значимости принято $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние D,L-пальмитоилкарнитина (PC) на митохондриальный потенциал и набухание митохондрий в присутствии ингибиторов фосфолипаз. Рисунок 1а, 1б характеризует влияние PC на митохондриальный потенциал в Состоянии 2 (без ADP, Mg^{2+} и гексокиназы в среде). Репрезентативные кривые представлены на рис. 1а. В контроле три последовательные добавки 20 мкМ PC вызывали рассеивание мембранного потенциала, обеспечивая критическую величину $PC^* = 60$ мкМ (сплошная кривая). Введение в среду инкубации 25 мкМ аристолюхой кислоты (Aristolochic acid, Arist), ингибитора Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы cPLA2, увеличивало величину PC^* до 80 мкМ. Лучший защитный эффект наблюдался при инкубации митохондрий с бромоенол лактоном ((R/S)-bromo-enol lactone, BEL, 25 мкМ) и PACOCF3 (PAC, 25 мкМ), ингибиторами Ca^{2+} -независимой фосфолипазы iPLA2 γ . В присутствии этих ингибиторов критическая концентрация PC^* превышала 100 мкМ. Средние величины PC^* для Arist, BEL и PAC составляли 95, 110 и 125 мкМ соответственно (рис. 1б). Ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 (CPT1) этмоксиром (Etomoxir 2, Eto, 25 мкМ) увеличивало PC^* до 85 мкМ. Наилучший защитный эффект обеспечивало ингибирование iPLA2 γ посредством PAC, приводящее к увеличению PC^* на 60–75% в сравнении с контролем.

Репрезентативные кривые, характеризующие влияние представленных выше ингибиторов на набухание митохондрий, показаны на рис. 1в–1ж. Критическая концентрация PC^* , при которой происходило полное набухание митохондрий, была 20 мкМ в контроле и возрастала до 50 мкМ в присутствии ингибитора iPLA2 γ PAC (40 мкМ). Менее выраженным был защитный эффект ингибитора cPLA2 Arist ($PC^* = 40$ мкМ), тогда как эффективность BEL и Eto ($PC^* = 30$ мкМ) не превышала 60% от величины защитного эффекта PAC. Как показано на рис. 1ж, эффект CsA был значительно слабее по сравнению с действием ингибиторов фосфолипаз. Средние критические концентрации PC^* для PAC, Arist, BEL, Eto и CsA представлены на панели 1з. Сравнение этих величин также свидетельствует о высокой эффектив-

ности PAC в предотвращении набухания митохондрий. В сравнении с контролем ($PC^* = 20 \pm 4$ мкМ) ингибирование iPLA2 γ посредством PAC увеличивало PC^* более чем в 2.5 раза, до 50–60 мкМ.

Таким образом, можно заключить, что в Состоянии 2 (без ADP) снижение митохондриального потенциала и активация набухания в присутствии PC происходят с вовлечением митохондриальной фосфолипазы iPLA2 γ .

Влияние PC на митохондриальный потенциал и дыхание митохондрий в Состоянии 3 в присутствии ингибиторов фосфолипаз или CPT1. Рисунок 2 показывает влияние PC на мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и дыхание митохондрий в Состоянии 3 (наличие ADP, Mg^{2+} и гексокиназы в среде) при введении в среду инкубации ингибиторов фосфолипаз или CPT1. Средняя критическая концентрация D,L-пальмитоилкарнитина (PC^*), при которой происходит рассеивание $\Delta\Psi_m$ в митохондриях печени крыс, при окислении пирувата и L-глутамата составляет 60–70 мкМ. В этих условиях аристолюхая кислота оказывает противоположный эффект, вызывая падение $\Delta\Psi_m$ и ингибирование дыхания даже в присутствии допороговых концентраций PC равных 50 мкМ (рис. 2а, 50 мкМ Arist, штриховые кривые). В то же время, при более низких концентрациях PC (20–30 мкМ), даже 100 мкМ Arist не оказывает какого-либо влияния на $\Delta\Psi_m$ и дыхание митохондрий (рис. 2б), что указывает на отсутствие прямого мембранотропного эффекта этого ингибитора. Сходный негативный эффект наблюдается при ингибировании CPT1. На рис. 2в показано, что наличие 20 мкМ EGTA в среде не препятствует открытию поры, индуцируемой 80 мкМ PC (рис. 2в, штриховые кривые), а ингибитор CPT1 этмоксир (Eto, 20 мкМ) усиливает действие PC, ускоряя снижение $\Delta\Psi_m$ и ингибируя дыхание митохондрий (точечные кривые).

В отличие от аристолюхой кислоты и этмоксира ингибиторы iPLA2 γ BEL и PAC в Состоянии 3 также обеспечивают защитный эффект, препятствуя индукции поры избытком PC. Рисунок 2г показывает, что введение в среду инкубации 30 мкМ BEL предотвращает рассеивание $\Delta\Psi_m$ в присутствии 80 мкМ PC. Ингибирование iPLA2 γ , вызываемое 40 мкМ PAC, также приводит к реактивации дыхания и предотвращает падение $\Delta\Psi_m$ при действии PC в высоких концентрациях, 100–120 мкМ (рис. 2з). Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что индукция поры избытком PC в Состоянии 3 также происходит с вовлечением митохондриальной iPLA2 γ .

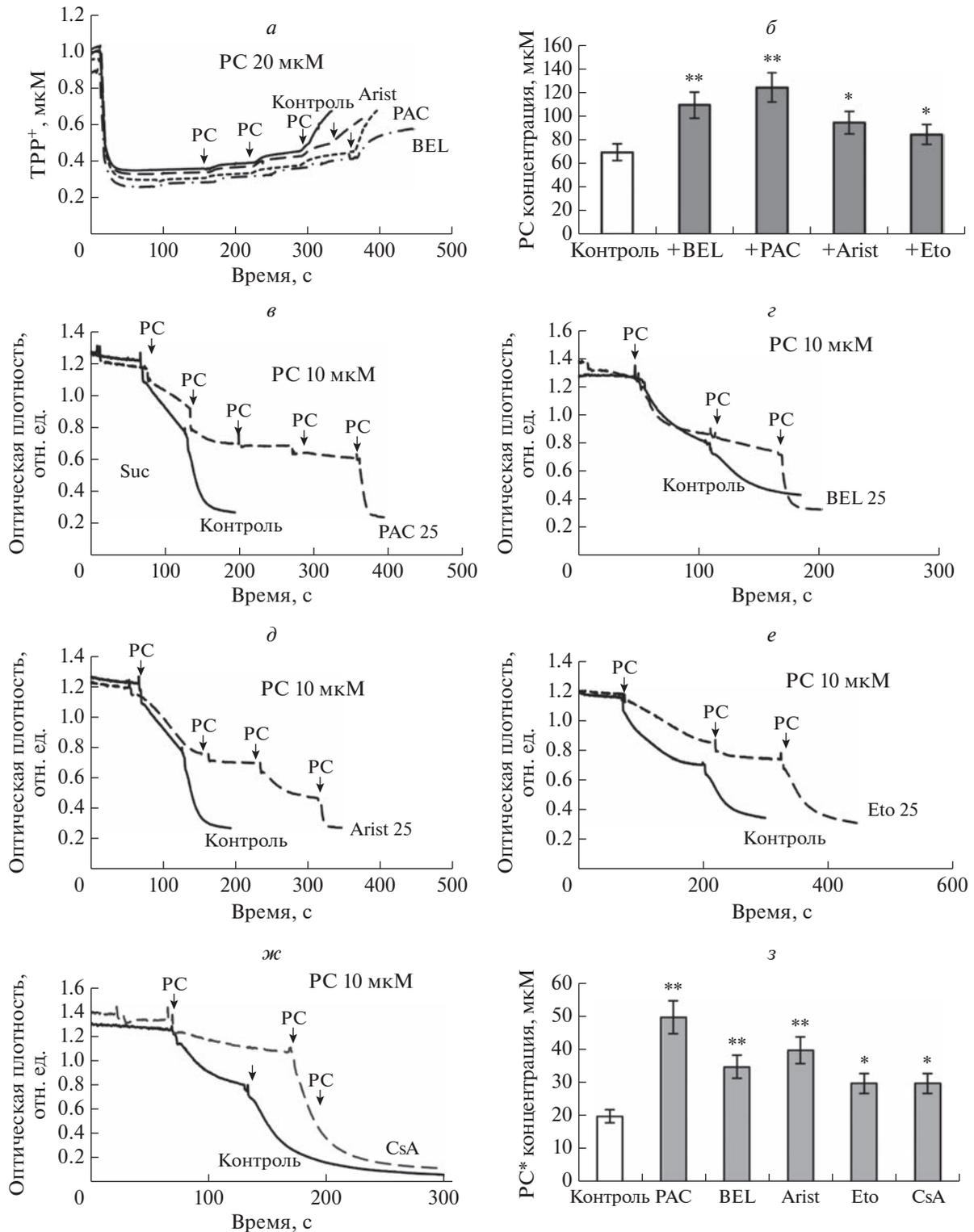


Рис. 1. Влияние пальмитоилкарнитина и ингибиторов фосфолипаз и карнитин-пальмитоилтрансферазы на мембранный потенциал и набухание митохондрий. Влияние последовательных добавок *D,L*-пальмитоилкарнитина (PC, 20 мкМ) и ингибиторов фосфолипаз (Arist, BEL, PAC) и карнитин-пальмитоилтрансферазы (Eto) в концентрации 25 мкМ на мембранный потенциал (а, б) и набухание митохондрий, индуцированное PC (10 мкМ каждая добавка) в контроле и в присутствии 25 мкМ PAC (в), BEL (г), Arist (д), Eto (е) и 1 мкМ CsA (ж). Средние критические концентрации PC*, индуцирующие набухание в присутствии этих ингибиторов, представлены на панели з. В среде инкубации 5 мМ сукцината и 0.4 и 1.2 мг/мл митохондриального белка при измерении набухания и мембранного потенциала соответственно. Концентрации ингибиторов и PC приведены в мкМ. $n = 6$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

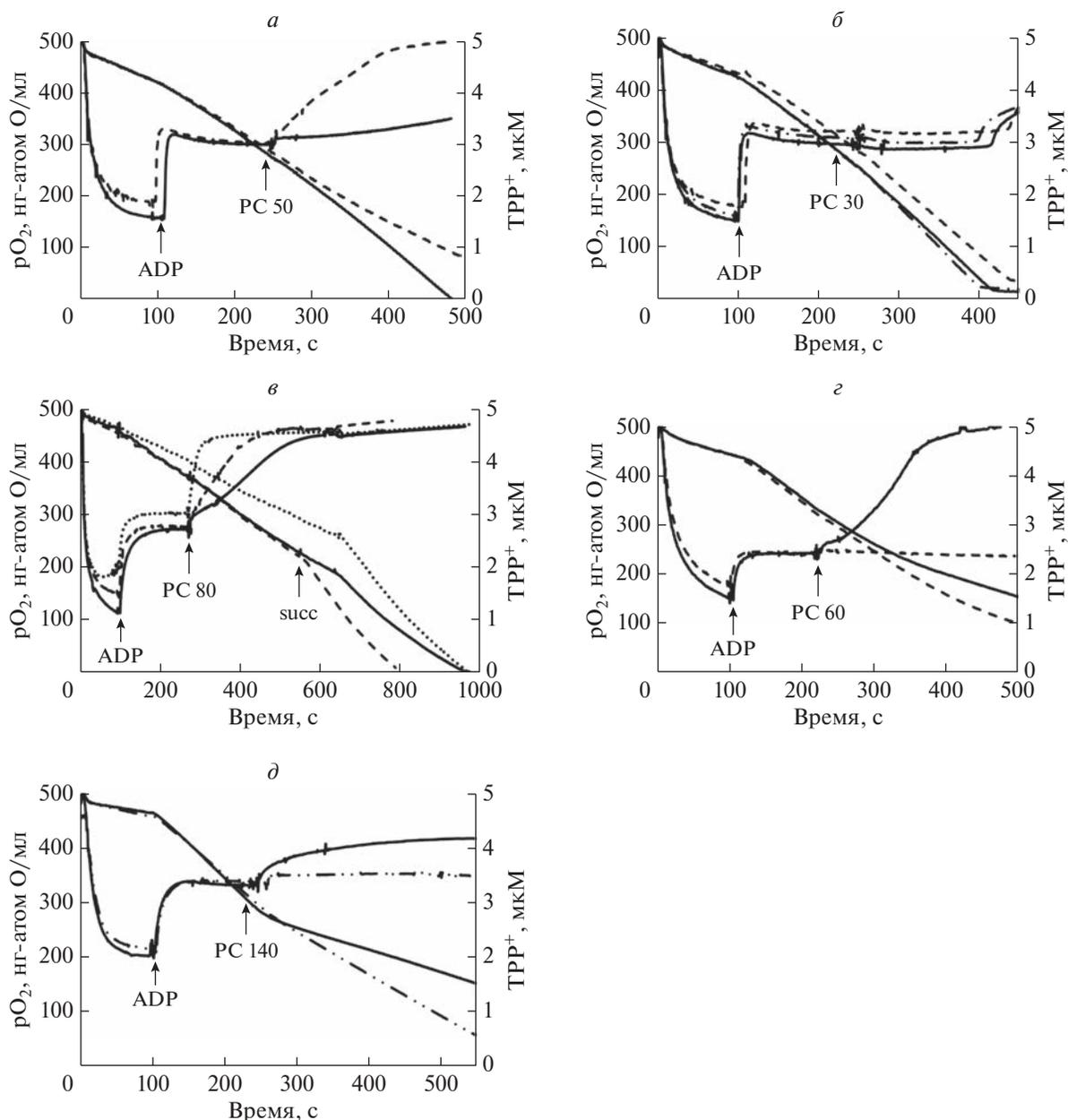


Рис. 2. Влияние РС на митохондриальный потенциал и дыхание митохондрий в Состоянии 3 в присутствии ингибиторов фосфолипаз или СРТ1. *a, б* – влияние *D,L*-пальмитоилкарнитина в допороговых концентрациях (РС, *a* – 50, *б* – 30 мкМ) на мембранный потенциал (TPP^+) и дыхание митохондрий в контроле (сплошные кривые) и в присутствии ингибитора фосфолипазы *sPLA*₂ аristoloxовой кислоты (*a* – 100 мкМ Agist, штриховые кривые; *б* – 50 и 100 мкМ Agist, штрих-пунктирные и штриховые кривые соответственно). *в* – влияние РС (80 мкМ) на мембранный потенциал и дыхание митохондрий в контроле (сплошные кривые) и в присутствии ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы (Eto, 20 мкМ, точечные кривые) или 20 мкМ EGTA (штриховые кривые) в среде. *з, д* – защитные эффекты ингибиторов фосфолипазы *iPLA*₂ γ бромоенол лактона (*з* – 30 мкМ BEL, штриховая кривая) и PACOCF3 (*д* – 40 мкМ PAC, штрих-пунктирная кривая) при ингибировании дыхания и падении мембранного потенциала, вызываемых РС (*з* – 60, *д* – 140 мкМ). В среде инкубации присутствовали: 1 мМ пируват, 10 мМ глутамат и 1 мг/мл митохондриального белка. Добавки ADP – 1 мМ. Концентрации ингибиторов и РС приведены в мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ca^{2+} -независимая фосфолипаза *iPLA*₂ γ локализована в митохондриях и пероксисомах [27] и активируется в присутствии только высоких (миллимолярных) концентраций двухвалентных метал-

лов, включая Mg^{2+} и Ca^{2+} [28]. Активация *iPLA*₂ γ приводит к увеличению продукции арахидоновой кислоты (AA, C20:4) и продуктов ее превращения – сигнальных молекул-лейкотриенов и простагландинов. Ряд данных свидетельствует об участии

iPLA2 γ в поддержании базального перекисного окисления липидов и ее цитопротекторной роли при окислительном стрессе [29]. Однако как увеличение, так и подавление экспрессии iPLA2 γ *in vivo* вызывает митохондриальные аномалии и дисфункцию, а также развитие ряда заболеваний, включая онкологические [25–27].

Окислительный стресс и деэнергизация митохондрий также могут приводить к активации iPLA2 γ , накоплению АА, токсичных продуктов ее окисления и стимуляции Ca^{2+} CsA-зависимой поры [30, 31]. Ингибирование или нокаут iPLA2 γ в клетках сердца [32] и печени [33] уменьшает вероятность открытия такой поры. Показано, что активация этой фосфолипазы при сердечной недостаточности или жировой диете приводит к активации липоксигеназного пути окисления АА в клетках сердца и печени и генерации токсичных 12-гидрокси-эйкозатетраеновых кислот (12-НЕТЕ), участвующих в индукции поры. Эти данные позволяют считать сигнальный путь с участием липоксигеназы-12 (LOX-12) одним из важных сигнальных путей, участвующих в активации Ca^{2+} -зависимой поры [34, 35].

Представленные результаты показывают, что ингибирование iPLA2 γ бромоенол лактоном или PACOCF3 препятствует индукции митохондриальной поры PC. Противоречивые эффекты ингибиторов Ca^{2+} -зависимой PLA2 и CPT1 на мембранный потенциал в Состояниях 2 и 3 (рис. 1б и 2) отчасти могут быть связаны с их неспецифическим действием. Учитывая известное мембранотропное действие ингибиторов фосфолипаз, таких как PACOCF3 и AACOCF3 [36], в данной работе мы использовали минимальные концентрации бромоенол лактона (30 мкМ) и PACOCF3 (40 мкМ), обеспечивающие защитный эффект.

Локализованная на внешней мембране митохондрий CPT1 участвует в превращении цитоплазматического пальмитоил-КоА в пальмитоилкарнитин (PC). Ее ингибирование этомоксиром не препятствует транспорту PC в митохондрии. Более того, этомоксир усиливает токсическое действие PC на митохондриальный потенциал и вызывает ингибирование дыхания (рис. 2а). Поэтому предполагаемое использование этомоксира как протектора токсического действия свободных жирных кислот при реперфузии может быть неэффективным.

Таким образом, представленные данные указывают на то, что Ca^{2+} -независимая iPLA2 γ может быть вовлечена в индукцию митохондриальной поры D,L-пальмитоилкарнитинном. Механизмы прямой или опосредованной активации iPLA2 γ и липоксигеназы-12 с участием карнитиновых и КоА производных жирных кислот пока неизвестны и могут представлять задачу для дальнейших исследований.

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

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

Соответствие принципам этики. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, сформулированными в Хельсинкской декларации по использованию лабораторных животных. Все процедуры на животных были одобрены комитетом по этике ИТЭБ РАН (Протокол 19/2022, 05 марта 2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hunter D.R., Haworth R.A. 1979. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. *Arch. Biochem. Biophys.* **195** (2), 468–477.
2. Crompton M., Ellinger H., Costi A. 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357–360.
3. Bernardi P., Broekemeir K.M., Pfeiffer D.R. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporine-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5), 509–517. <https://doi.org/10.1007/BF00762735>
4. Kwong J.Q., Molkentin J.D. 2015. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* **21** (2), 206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>
5. Ford D.A., Han X., Horner C.C., Gross W. 1996. Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: Metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. *Biochemistry.* **35** (24), 7903. <https://doi.org/10.1021/bi960552n>
6. Lesnefsky E.J., Moghaddas S., Tandler B., Kerner J., Hoppel C.L. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia—reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33** (6), 1065–1089. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1378>
7. Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D., Muoio D.M. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7** (1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
8. Fromenty B., Robin M.A., Igoudjil A., Mansouri A., Pessayre D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* **30** (2), 121–138. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70098-8](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70098-8)
9. Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Volska K., Kuka J., Makarova E., Antone U., Sevostjanovs E., Vilskersts R., Strods A., Tars K., Dambrova M. 2016. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem. J.* **473** (9),

- 1191–1202.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160164>
10. Erfle J.D., Sauer F. 1969. The inhibitory effects of acyl-coenzyme A esters on the pyruvate and alpha-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **178** (3), 441–452.
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90213-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90213-7)
 11. Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochem. Res.* **16** (7), 795–803.
 12. Farrell H.M. Jr, Wickham E.D., Reeves H.C. 1995. Effects of long-chain acyl-coenzyme A's on the activity of the soluble form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* **321** (1), 199–208.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1386>
 13. Paulson D.J., Shug A.L. 1984. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **766** (1), 70–76.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90218-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90218-4)
 14. Schoënfeld P., Bohnensack R. 1997. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Letters.* **420**, 167–170.
 15. Ciapaite J., Van Eikenhorst D., Bakker S., Diamant M., Heine R.J., Wagner M.J., Westerhoff H.V., Krab K. 2005. Modular kinetic analysis of the adenine nucleotide translocator-mediated effects of palmitoyl-CoA on the oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Diabetes.* **54** (4), 944–951.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.944>
 16. Wojtczak L., Wieckowski M.R. 1999. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 447–455.
 17. Sultan A., Sokolove P.M. 2001. Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **386** (1), 37–51.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2194>
 18. Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C., Gritsenko E., Pavlov E., Lazareva A.V., Limarenko E., Rey C., Louisot P., Saris N.E. 2001. Palmitic and stearic acids bind Ca²⁺ with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to Ca²⁺-activated mitochondrial pores. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33** (4), 319–331.
<https://doi.org/10.1023/a:1010659323937>
 19. Mironova G.D., Pavlov E.V. 2021. Mitochondrial cyclosporine A-independent palmitate/Ca²⁺-induced permeability transition pore (PA-mPT Pore) and its role in mitochondrial function and protection against calcium overload and glutamate toxicity. *Cells.* **10**, 125.
<https://doi.org/10.3390/cells10010125>
 20. Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынный В.В. 2022. Индукция митохондриальной циклоспорин-зависимой поры ацилкарнитинами. Влияние концентрации и длины углеводной цепи. *Биол. мембраны.* **39** (1), 75–82.
<https://doi.org/10.31857/S0233475522010066>
 21. Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2020. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* **287** (8), 1525–1536.
<https://doi.org/10.1111/febs.15090>
 22. Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Nenov M.N., Kasyrov V.A., Pimenov O.Y., Dynnik V.V. 2020. Dissecting cellular mechanisms of long-chain acylcarnitines-driven cardiotoxicity: Disturbance of calcium homeostasis, activation of Ca²⁺-dependent phospholipases, and mitochondrial energetics collapse. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (20), 7461.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207461>
 23. Hollander J.M., Thapa D., Shepherd D.L. 2014. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: Influence of cardiac pathologies. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **307**, H1–H14.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2013>
 24. Caro A.A., Cederbaum A.I. 2007. Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **457** (2), 252–263.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.10.018>
 25. Saito Y., Watanabe K., Fujioka D., Nakamura T., Obata J., Kawabata K., Watanabe Y., Mishina H., Tamaru S., Kita Y., Shimizu T., Kugiyama K. 2012. Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A2 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF- α -mediated pathway. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **302**, H2018–H2030.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00955.2011>
 26. Asemu G., Dhalla N.S., Tappia P.S. 2004. Inhibition of PLC improves postischemic recovery in isolated rat heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **287** (6), H2598–H2605.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00506.2004>
 27. Hara S., Yoda E., Sasaki Y., Nakatani Y., Kuwata H. 2019. Calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) and its roles in cellular functions and diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* **1864** (6), 861–868.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.009>
 28. Moon S.H., Jenkins C.M., Liu X., Guan S., Mancuso D.J., Gross R.W. 2012. Activation of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) by divalent cations mediating arachidonate release and production of downstream eicosanoids. *J. Biol. Chem.* **287** (18), 14880–14895.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336776>
 29. Kinsey G.R., Blum J.L., Covington M.D., Cummings B.S., McHowat J., Schnellmann R. 2008. Decreased iPLA2 γ expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J. Lipid Res.* **49** (7), 1477–1487.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M800030-JLR200>
 30. Kinsey G.R., McHowat J., Patrick K.S., Schnellmann R.G. 2007. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 γ in Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321** (2), 707–715.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.119545>

31. Rauckhorst A.J., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. 2014. Regulation of the Ca²⁺-independent phospholipase A2 in liver mitochondria by changes in the energetic state. *J. Lipid Res.* **55** (5), 826–836. <https://doi.org/10.1194/jlr.M043307>
32. Williams S.D., Gottlieb R.A. 2002. Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem. J.* **362** (Pt 1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620023>
33. Moon S.H., Jenkins C.M., Kiebish M.A., Sims H.F., Mancuso D.J., Gross R.W. 2012. Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A(2) γ (iPLA(2) γ) attenuates calcium-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore and resultant cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **287** (35), 29837–29850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373654>
34. Moon S.H., Liu H., Cedars A.M., Yang C., Kiebish M.A., Joseph S.M., Kelley J., Jenkins C.M., Gross R.W. 2018. Heart failure-induced activation of phospholipase iPLA 2 γ generates hydroxyeicosatetraenoic acids opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **293** (1), 115–129. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000405>
35. Moon S.H., Diltthey B.G., Liu X., Guan S., Sims H.F., Gross R.W. 2021. High-fat diet activates liver iPLA2 γ generating eicosanoids that mediate metabolic stress. *J. Lipid Res.* **62**, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100052>
36. Dubinin M.V., Astashev M.E., Penkov N.V., Gudkov S.V., Dyachenko I.A., Samartsev V.N., Belosludtsev K.N. 2016. Effects of phospholipase A2 inhibitors on bilayer lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **249** (3), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9872-7>

Involvement of the Mitochondrial Ca²⁺-Independent Phospholipase iPLA2 in the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Long-Chain Acylcarnitines

N. I. Fedotcheva¹, E. V. Grishina¹, V. V. Dynnik¹, *

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*
**e-mail: dynnik@rambler.ru*

It is known that activated derivatives of long-chain fatty acids acylcarnitines (LCAC) are considered the most toxic, which, along with calcium, can participate in the induction of mitochondrial permeability transition pore, involving various types of phospholipases in the complex mechanisms of pore activation. In this work, we investigated the influence of different inhibitors of phospholipases and carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) on the induction of mitochondrial permeability transition pore by *D,L*-palmitoylcarnitine (PC, C16:0). In the experiments on isolated rat liver mitochondria, the effects of PC on mitochondrial respiration rate, mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$), and mitochondrial swelling were examined. It was shown that the application of the inhibitors of carnitine palmitoyltransferase-1 (Etomoxir 2), Ca²⁺-dependent phospholipase cPLA2 (Aristolochic acid), or Ca²⁺-independent phospholipase iPLA2 γ ((*R/S*)-bromo-enol lactone (BEL) and PACOCF3) caused an increase in the critical concentrations of *D,L*-palmitoylcarnitine (PC*) required for $\Delta\Psi_m$ dissipation and mitochondrial swelling. The most pronounced protective effect was caused by PACOCF3 and BEL. In state 3 of respiration (ADP + Mg²⁺ + hexokinase), Etomoxir 2 and Aristolochic acid enhanced respiration inhibition induced by excess *D,L*-palmitoylcarnitine and promoted dissipation of $\Delta\Psi_m$, while the inhibitors of iPLA2 γ prevented the dissipation of $\Delta\Psi_m$ evoked by *D,L*-palmitoylcarnitine and caused an increase in the rate of mitochondrial respiration. Thus, the results obtained indicate the involvement of mitochondrial iPLA2 γ in the induction of mitochondrial permeability transition pore by long-chain acylcarnitines.

Keywords: long chain acylcarnitines, mitochondrial permeability transition pore, calcium-independent iPLA2 γ

УДК 557.175.6

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. К. Ю. Шардина^а, *, В. П. Тимганова^а, М. С. Бочкова^а,
С. В. Ужвиюк^а, С. А. Заморина^а

^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: Shardinak@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 24.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Изучали влияние рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (hCG) в концентрациях, соответствующих беременности (10 и 100 МЕ/мл) на дифференцировку и функциональную активность миелоидных супрессорных клеток (MDSC). Объектом исследования были изолированные CD11b⁺-клетки, которые индуцировали в фенотип MDSC при помощи двухэтапного активирования цитокинами GM-CSF, IL1 β и липополисахаридом (LPS). После недельного культивирования оценивали общий уровень MDSC с учетом субпопуляций M-MDSC и PMN-MDSC, экспрессию аргиназы-1 (Arg1) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в этих клетках, а также цитокиновый профиль в супернатантах культур клеток. Показано, что hCG повышал уровень общего количества MDSC, а его более низкая концентрация (10 МЕ/мл) способствовала дифференцировке субпопуляции M-MDSC. Установлено, что hCG не оказывал влияния на экспрессию IDO в MDSC, однако наблюдалась тенденция к повышению экспрессии IDO под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл. Показано, что CD11b⁺-клетки, индуцированные в фенотип MDSC, экспрессируют низкое количество Arg1, что не позволило оценить эффект гормона на экспрессию этого фермента. При оценке цитокинового профиля методом мультиплексного анализа установлено, что hCG не модулировал продукцию цитокинов в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC. Таким образом, впервые продемонстрировано, что hCG способен индуцировать дифференцировку MDSC.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки (MDSC), культивирование *in vitro*, хорионический гонадотропин человека (hCG), CD11b⁺-клетки, IDO, Arg1, цитокины

DOI: 10.31857/S0233475523050092, **EDN:** THVNKD

ВВЕДЕНИЕ

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) – клетки миелоидного происхождения, которые обладают иммуносупрессорным потенциалом с помощью широкого спектра механизмов. Одним из самых важных механизмов является нарушение метаболизма аргинина и триптофана. Для этого MDSC используют аргиназу-1 (Arg1), индуцибельную NO-синтазу (iNOS, NOS2) и индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO). Суть механизма сводится к тому, что ферменты создают условия недостаточности питательной среды, что в итоге приводит к подавлению активности Т-лимфоцитов и образованию супрессорной среды в месте иммунного ответа [1, 2]. Известно, что у здоровых людей уровень MDSC в периферической крови не превышает 1% [3], однако при патологических состояниях, таких

как онкологические заболевания, аутоиммунные расстройства, воспаления и инфекции, их уровень повышается. Недавно стало известно, что количество MDSC может увеличиваться также и при физиологическом состоянии – при беременности.

У MDSC принято выделять две субпопуляции: полиморфноядерные или гранулоцитарные (PMN-MDSC, G-MDSC, CD33^{low}CD11b⁺CD14⁻CD15⁺/CD66b⁺-клетки) и моноцитарные (M-MDSC, CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low}CD15⁻/CD66b⁻-клетки).

В настоящее время очевидно, что MDSC играют двойственную роль в организме, например, при онкологических заболеваниях они способны поддерживать рост опухоли, способствуя метастазированию, а при беременности проявлять положительные эффекты, подавляя иммунный

ответ на антигены плода и, таким образом, формируя иммунную толерантность [4]. Например, известно, что MDSC способны индуцировать развитие Т-хелперов 2 типа и Т-регуляторных клеток (Treg), реализуя свои основные механизмы подавления через Arg1, IDO, iNOS и активные формы кислорода и азота [5]. Существует прямая связь с ранним выкидышем и снижением уровня MDSC в периферической крови матери, эндометрии и плаценте [6].

Иммунная толерантность при беременности — это сложный процесс, в котором принимают участие разные структуры и органы, включая белково-пептидный континуум [7]. Во время беременности синтезируется множество уникальных белков, направленных на поддержание развития плода. Помимо прямых физиологических функций некоторые белки способны проявлять иммунорегуляторные эффекты. Одним из таких белков является хорионический гонадотропин человека (human chorionic gonadotropin, hCG).

Хорионический гонадотропин — гликопротеин, синтез которого достигает максимума на 9–11 неделе беременности, а затем снижается и держится на одном уровне вплоть до родов. hCG участвует в основных репродуктивных процессах, таких как поддержание желтого тела, образование синцитиотрофобласта, формирование пуповины, рост органов плода [8]. В отношении роли hCG в поддержании иммунной толерантности известно, что исследуемый гормон способен: 1) угнетать пролиферацию и индуцировать апоптоз нейтрофилов, чрезмерная активность которых коррелирует с неблагоприятными исходами беременности [9, 10]; 2) частично поддерживать важное для беременности переключение макрофагов во второй иммуносупрессивный тип [11, 12]; 3) через взаимодействие с маннозным рецептором увеличивает концентрацию маточных НК-клеток, необходимых для имплантации эмбриона [13]; 4) повышать уровень фермента IDO как *in vitro*, так и *in vivo* [14]; 5) стимулировать дифференцировку Treg [15].

Получение MDSC в системе *in vitro* является отдельной проблемой, поскольку их содержание в крови здоровых доноров крайне мало. Для того чтобы получить такую редкую популяцию, важно определить маркер, с помощью которого можно изолировать определенную часть клеток для дальнейшей дифференцировки. Поскольку фенотип MDSC — CD33⁺HLA-DR^{-/low}CD11b⁺, подходящими маркерами могут выступать только две молекулы — CD33 или CD11b. В наших ранних исследованиях было показано, что один из фетоплацентарных белков, альфа-фетопроtein (AFP) не влияет на конверсию CD33⁺-клеток в фенотип MDSC [16], поэтому возникла необходимость поиска другой экспериментальной модели.

Целью данной работы было изучение роли hCG в регуляции дифференцировки и функциональной активности MDSC, генерированных из CD11b⁺-клеток. Для выполнения исследования были поставлены следующие задачи: 1) изучить роль hCG в регуляции общего уровня MDSC, а также M-MDSC и PMN-MDSC в культуре; 2) измерить внутриклеточную экспрессию ферментов Arg1 и IDO в MDSC для понимания функционального состояния популяции; 3) оценить цитокинный профиль клеточных культур CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено согласно Хельсинской декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 18.08.2020.

Объекты исследования. В работе были использованы мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) условно здоровых доноров ($n = 7$, небеременные женщины, 20–40 лет). РВМС получали центрифугированием на градиенте плотности фикола ($\rho = 1.077$ г/см³, Diacoll, ДиаМ, Россия). Из РВМС крови доноров методом иммуномагнитной сепарации выделяли CD11b⁺-клетки, используя магнитные сферы MacsBeads с антителами к молекуле CD11b и разделительную колонку MS (MiltenyiBiotec, Германия).

В экспериментах были использованы физиологические концентрации рекомбинантного hCG (Овитрель, Израиль), которые соответствуют уровням белка в периферической крови матери в период беременности: 10 и 100 МЕ/мл. Концентрация hCG на 10–12 неделе беременности достигает максимума и составляет в среднем 100 МЕ/мл, после чего снижается до 10 МЕ/мл и держится на низком уровне до окончания беременности [17].

Схема культивирования MDSC. В нашем исследовании мы использовали модель индукции MDSC, основанную на двухэтапном добавлении сигнальных молекул в культуру [1]. Смысл этой схемы состоит в том, что на первом этапе происходит “лицензирование”, которое направляет клетки на путь миелоидного развития. Для этого мы использовали фактор миелоидного роста клеток — GM-CSF. Второй этап — клеточная активация, при которой происходит иницирование сигнальных путей, благодаря которым клетки реализуют супрессорные функции.

Выделенные CD11b⁺-клетки засеивали в плоскостонный 96-луночный планшет (Corning, США) в концентрации 1×10^6 кл/мл с добавлением полной питательной среды (RPMI-1640, 10% эмбри-

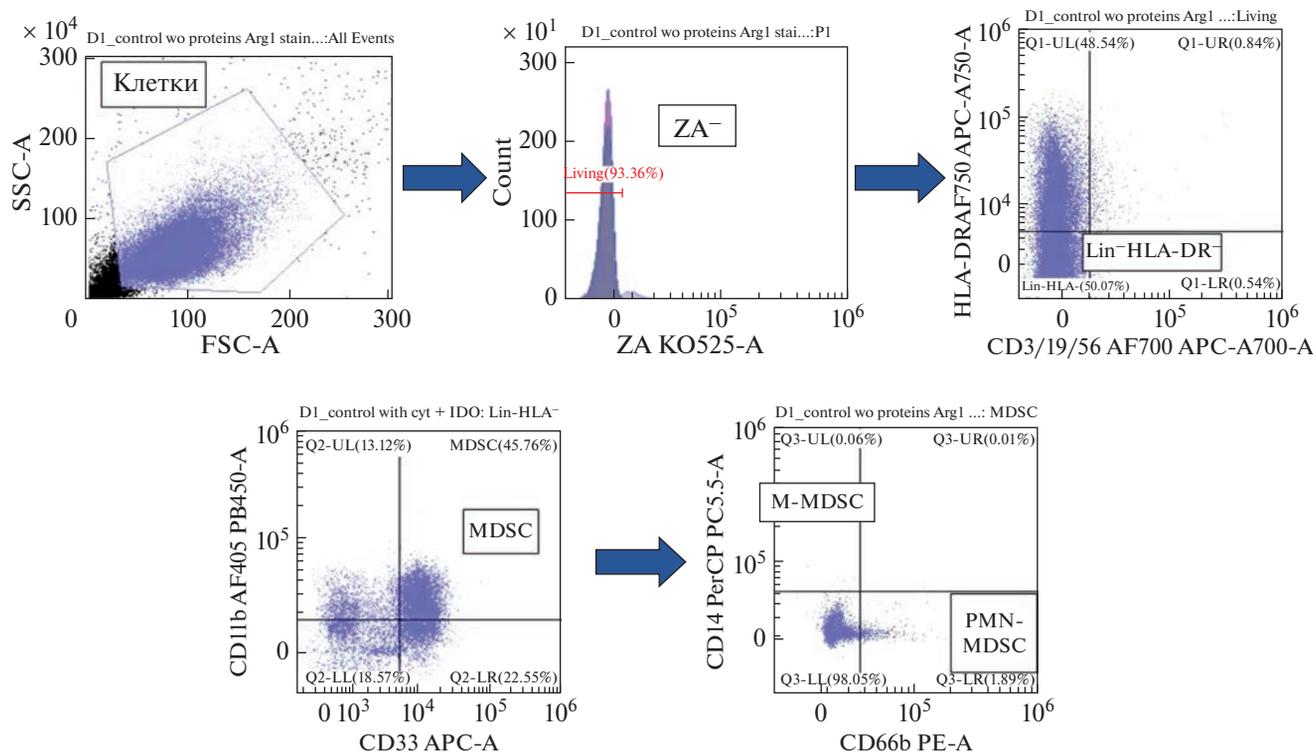


Рис. 1. Тактика гейтирования MDSC по поверхностным маркерам, используемая для идентификации клеток. Субпопуляции MDSC классифицируются как $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD66b}^+ \text{CD14}^-$ для PMN-MDSC и $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD66b}^- \text{CD14}^+$ для M-MDSC.

ональная бычья сыворотка (FBS), 10 мМ HEPES (ICN Ph, США), 2 мМ *L*-глутамин (ICN Ph.) и 100 мкг/мл пенициллина–стрептомицина–амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, ВІ, Израиль)). В первый день культивирования в лунки вносили GM-CSF (Miltenyi Biotec) в концентрации 20 нг/мл, после чего клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе в течение 2 сут.

На 3-и сут производили активацию клеток с использованием провоспалительного цитокина $\text{IL1-}\beta$ в концентрации 20 нг/мл (Miltenyi Biotec) и LPS в концентрации 0.1 мкг/мл (Sigma Aldrich, США). Помимо этого, производили смену питательной среды, а после добавления молекул активации, клетки культивировали еще 3 сут.

Проточная цитометрия. После недели культивирования клетки окрашивали мечеными флуорохромами антителами: anti-HLA-DR-AlexaFluor750, anti-CD33-APC, anti-CD11b-AlexaFluor405, anti-CD66b-PE, anti-CD14-PerCP (R&D Systems, США). Также для того чтобы исключить возможное присутствие лимфоцитов и НК-клеток, использовали три красителя: anti-CD19-AF700, anti-CD56-AF700, anti-CD3-AF700 (Lin). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали FMO (fluorescence minus one) пробы. Регистрация результатов была произведе-

на на проточном цитофлуориметре Cytoflex S (Beckman Coulter, США).

По данным бокового (SSC, side scatter) и прямого светорассеяния (FSC, forward scatter) осуществляли гейтирование. После этого определяли живые клетки с использованием красителя Zombie Aqua (Biolegend, США), выделяя в этом регионе клетки, не несущие линейные маркеры (Lin) и HLA-DR. Затем эту популяцию отображали на двухпараметрическом графике CD33 и CD11b ($\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+$ или MDSC). Для определения субпопуляций MDSC дополнительно оценивали наличие маркеров CD66b и CD14. Ниже приведена тактика гейтирования клеток на примере одного эксперимента (рис. 1).

Оценка экспрессии Arg1 и IDO в MDSC. Был проведен анализ внутриклеточной экспрессии ферментов Arg1 и IDO путем пермеабиллизации клеток с помощью моноклональных антител к IDO (R&D Systems) и Arg1 (R&D Systems). Измерения проводили также методом проточной цитофлуориметрии.

Анализ цитокинового профиля в культурах CD11b^+ -клеток. Определение цитокинов производили, используя супернатанты культур с помощью коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1 37-plex (BioRad Laboratories,

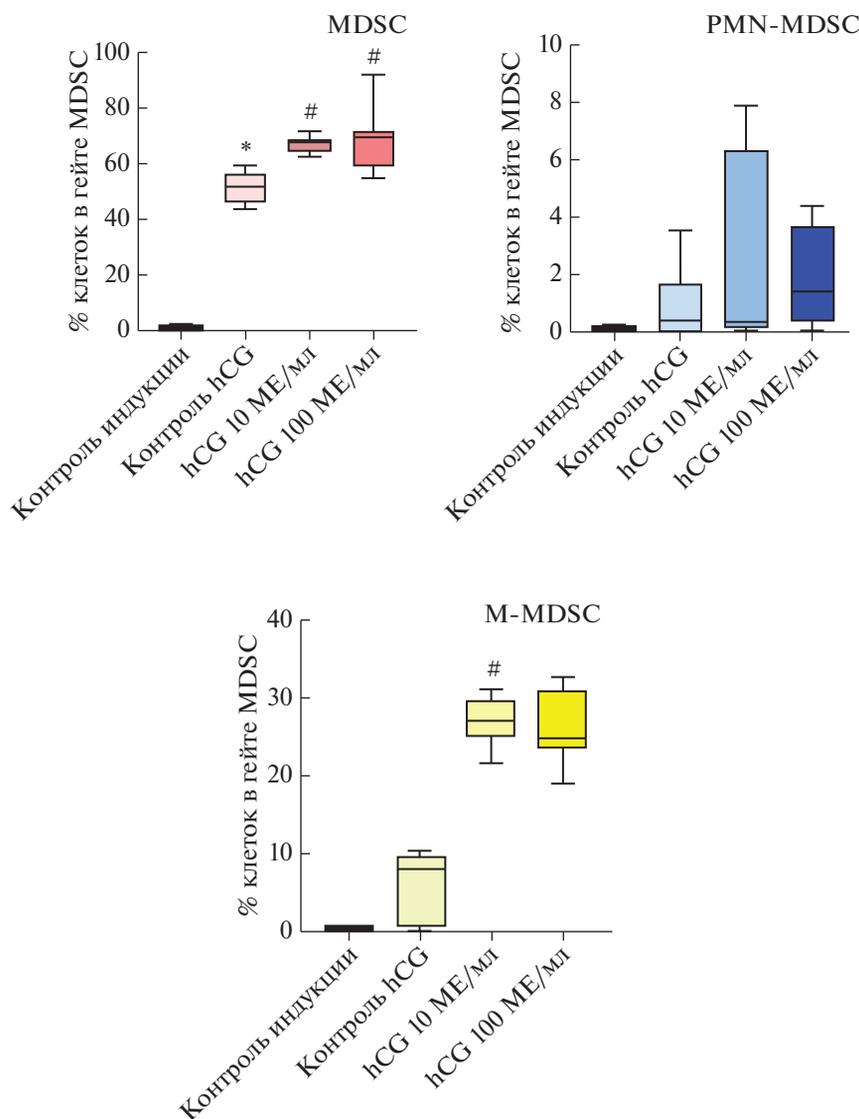


Рис. 2. Влияние hCG на дифференцировку MDSC и их субпопуляций (PMN-MDSC и M-MDSC) ($n = 7$, Me (Q1–Q3)). # – статистически значимые ($p < 0.05$) различия по сравнению с контролем индукции, * – статистически значимые ($p < 0.05$) различия по сравнению с контролем hCG с использованием непараметрического критерия Фридмана.

США) методом Luminex xMAP. Результаты регистрировали, используя систему мультиплексного анализа Bio-Plex MAGPIX (BioRad Laboratories). Обработка данных была осуществлена в программе Belysa. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Результаты представлены в пг/мл.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8. Для сравнения зависимых выборок был использован непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений – критерий Фридмана. Статистические различия считались значимыми при $p < 0.05$. Часть

данных представлена в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1–Q3)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние hCG на дифференцировку MDSC, PMN-MDSC и M-MDSC. По истечении 7 сут культивирования клеток их жизнеспособность составила 98.13 (94.09–98.84)%. В наших экспериментах выбранные цитокины способны направлять индукцию CD11b⁺-клеток в MDSC, что свидетельствует об адекватности выбранной модели (рис. 2).

Показано, что hCG в обеих концентрациях повышал общий уровень MDSC в культуре (рис. 2).

Таблица 1. Влияние hCG на внутриклеточную экспрессию Arg1 и IDO в MDSC в культуре CD11b⁺-клеток после 7 сут инкубации (*n* = 7, Me (Q1–Q3))

	Arg1, %	IDO, %
Контроль индукции	0.150 (0.025–0.447)	0.49 (0.245–0.736)
Контроль hCG	0.920 (0.212–1.538)	7.84 (6.74–9.177)
hCG 10 МЕ/мл	1.335 (0.39–1.978)	15.11 (14.297–15.65)
hCG 100 МЕ/мл	0.145 (0.082–0.312)	7.72 (6.207–9.797)

Примечание: результаты выражены в процентах от общей популяции MDSC в культуре; для статистического анализа был использован непараметрический критерий Фридмана, в результате достоверных различий ($p < 0.05$) не обнаружено.

Что касается субпопуляций, то установлено, что hCG (10 МЕ/мл) способен достоверно увеличивать уровень M-MDSC, но не PMN-MDSC. Скорее всего, это связано с тем, что наша модель получения MDSC не способствуют образованию субпопуляции PMN-MDSC. Известно, что при беременности расширение пула MDSC происходит за счет PMN-MDSC, однако M-MDSC также играют важную регуляторную роль [2]. На сегодняшний день нет исследований во взаимодействии фетоплацентарных гормонов с MDSC, тем не менее известно влияние гормонов на дифференцировку MDSC. Так, эстрадиол в зависимости от его концентрации может играть дихотомическую роль на MDSC [18]. Также известно, что уровень M-MDSC положительно коррелирует с уровнями прогестерона и эстрогена в сыворотке беременных женщин, а введение 17 β -эстрадиола, но не прогестерона, усиливал как экспансию, так и супрессивную активность M-MDSC через преобразователь сигнала и активатор транскрипции (STAT-3) [19].

Влияние hCG на экспрессию ферментов Arg1 и IDO. Для определения MDSC важно помнить, что эта клеточная популяция не имеет уникального маркера, поэтому для идентификации MDSC необходимо учитывать их функциональные характеристики. Один из иммуносупрессивных механизмов MDSC – синтез ферментов, таких как Arg1, IDO. Их действие основано на истощении питательных веществ – аргинина и триптофана в месте иммунного ответа, что приводит к подавлению пролиферации и активности Т-клеток [20, 21]. В настоящем исследовании был оценен уровень IDO и Arg1.

В результате проведенного исследования показано, что hCG не влиял на экспрессию Arg1 (табл. 1). Однако чрезвычайно низкий уровень экспрессии этого фермента свидетельствует не об отсутствии эффекта гормона, а о том, что в наших

экспериментальных условиях Arg1 не индуцируется. Возможно, это связано с тем, что индукция Arg1 происходит в противовоспалительном микроокружении, а также в присутствии антигенной стимуляции [22, 23]. Также известно, что цитокины, продуцируемые Т-клетками 2 типа (IL-4, IL-13) способны индуцировать Arg1 в макрофаги 2 типа и в MDSC [24]. Еще одним объяснением может быть тот факт, что ингибирование, опосредованное MDSC, требует прямого контакта с клеткой, а Arg не экспрессируется в MDSC конститутивно. Цитокин-индуцированная экспрессия аргиназы-1 может сводиться к 2 стратегиям: 1) IL-6 + IL-4 – IL-6 индуцирует экспрессию IL-4-рецептора (IL-4R) на поверхности клеток, и через этот рецептор и запускается продукция аргиназы-1; 2) GM-CSF + IL-10, где GM-CSF аналогично индуцирует IL-10 [25]. В нашей же экспериментальной модели был использован другой набор цитокинов для индукции. Тем не менее на сегодняшний день механизм экспрессии аргиназы в MDSC остается не до конца выясненным.

В отношении экспрессии IDO достоверных эффектов hCG также не было обнаружено. Однако присутствует видимая тенденция к увеличению уровня экспрессии этого фермента почти в два раза под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл (табл. 1).

Таким образом, показано, что hCG не оказывает влияния на экспрессию IDO в MDSC, однако наблюдается тенденция к повышению уровня IDO под воздействием hCG в концентрации 10 МЕ/мл. Представленная экспериментальная система не позволяет в полной мере оценить влияние гормона на экспрессию Arg1.

Влияние hCG на цитокиновый профиль в супернатантах культур CD11b⁺-клеток. Иммунные реакции организма опосредованы сигнальными молекулами – цитокинами. Цитокины, обладая различными эффектами, как провоспалительны-

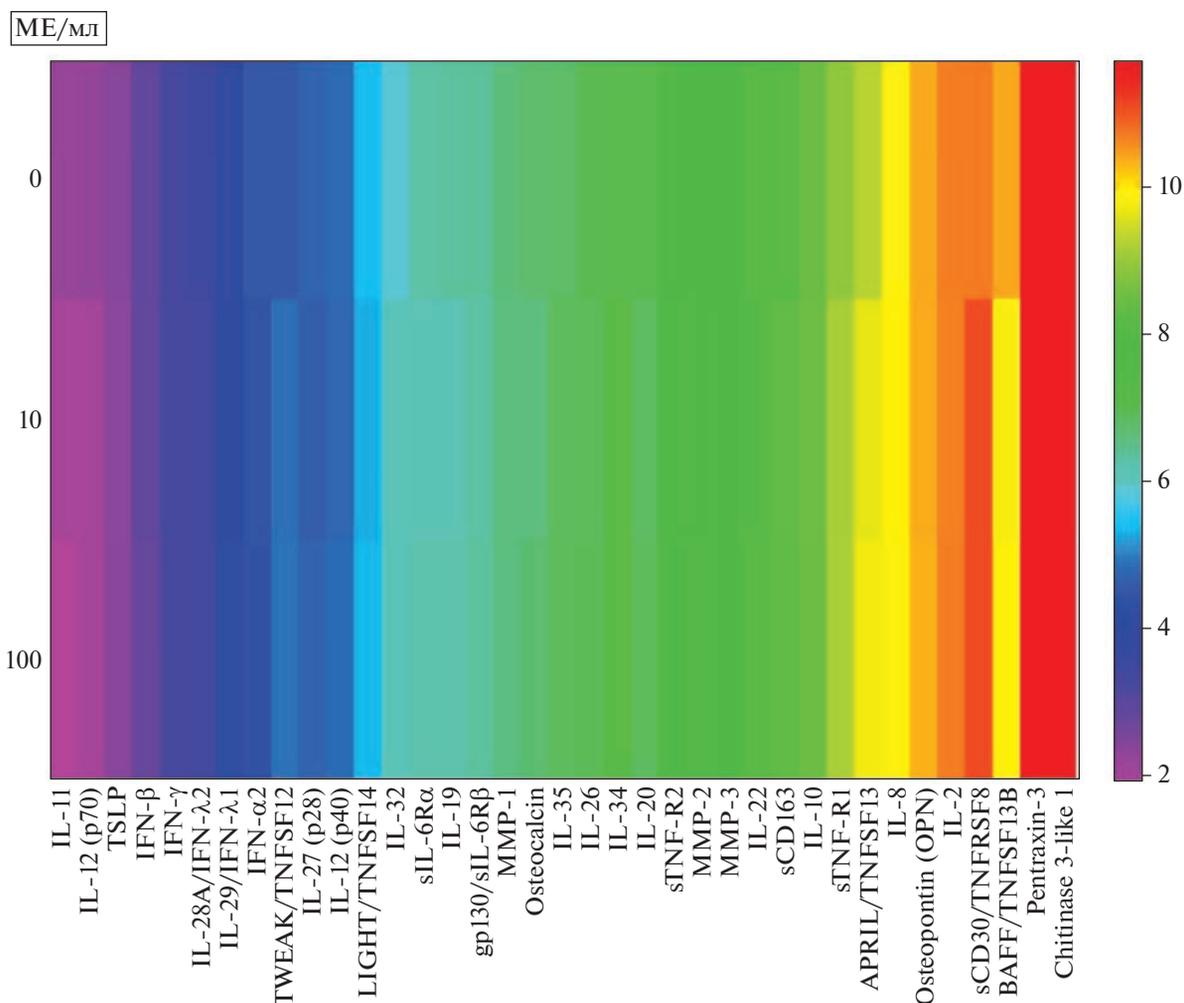


Рис. 3. Тепловая карта эффектов hCG на цитокиновый профиль супернатантов культур. В построении тепловой карты использованы натуральные логарифмы концентраций цитокинов.

ми, так и противовоспалительными, обеспечивают связи различные системы органов между собой.

В нашем исследовании был использован метод мультиплексного анализа цитокинов. В результате проведенного исследования установлено, что достоверного влияния hCG на следующие цитокины и биологически активные молекулы обнаружено не было: IL-27 (p28), IL-2, IL-8, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-20, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A/IFN λ 2, IL-32, IL-34, LIGHT/TNFSF14, TSLP, TWEAK/TNFSF12, IL-22, IL-10, IL-11, IL-19, IL-35, Pentraxin3, Chitinase3-like, APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sTNFR-1, sTNFR-2, sCD30/TNFRSF8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, sCD163, gp130/sIL-6R β , sIL-6R α , osteocalcin, osteopontin, IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ (рис. 3).

Таким образом, установлено, что hCG не оказывает влияния на экспрессию изучаемых цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для протекания успешной беременности необходимо скоординировано поддерживать иммунную толерантность. Иммунная толерантность заключается в отсутствии материнского организма формировать иммунный ответ на развивающийся плод и плаценту. Поскольку этот тонкий процесс должен иметь баланс между защитой организма матери и плода от инфекций и толерантностью к антигенам эмбриона, то его регуляция происходит на всех уровнях организации. В первую очередь формируется преобладание Treg и Th2-клеток над Th17 и Th1-клетками [26]. На сегодняшний день стало очевидно, что врожденная система также принимает участие в формировании иммунной толерантности. Так, в 2011 году установлено, что MDSC являются клетками, принимающими важное участие в этом процессе [27].

В результате проведенных экспериментов установлено, что ключевой белковый гормон бере-

менности hCG достоверно повышает уровень MDSC, включая субпопуляцию M-MDSC. Однако стоит отметить, что низкая концентрация hCG (10 МЕ/мл) оказывала более выраженное воздействие на дифференцировку M-MDSC. Пик экспрессии hCG соответствует границе первого и второго триместров беременности (11–12 неделя) и совпадает с пиком экспрессии стадийспецифичных антигенов плода, связанной с основной закладкой новых тканей. Именно этот период считается наиболее уязвимым для атаки иммунной системой материнского организма. Первый триместр беременности является провоспалительным, а задача иммунной системы матери на этом этапе – содействие имплантации эмбриона. Низкая концентрация hCG соответствует началу беременности, когда иммунная толерантность особенно важна, поскольку от нее напрямую зависит сохранение плода. В начале беременности эмбрион экспрессирует аллоантигены, а затем и стадийспецифичные антигены, которые являются чужеродными для материнского организма [28].

Продемонстрировано, что hCG не влияет на экспрессию Arg1 и IDO в MDSC, тем не менее наблюдается общая тенденция также низкой концентрации hCG (10 МЕ/мл) на увеличение уровня фермента IDO в клетках. Помимо этого, hCG не влиял на продукцию цитокинов иммунными клетками, возможно, это связано с тем, что hCG проявляет иммуномодулирующие свойства на другом уровне. Так, известно, что hCG повышает уровень регуляторной популяции – Treg [15].

В целом полученные нами эффекты касаются только субпопуляции M-MDSC, которая, вероятно, является мишенью для hCG.

Ранее мы исследовали влияние других фетоплацентарных белков – альфа-фетопротейна (AFP), гликоделина (Gd) и трофобластического β 1-гликопротеина (PSG) в той же экспериментальной модели. Нами было показано, что PSG стимулировал конверсию CD11b⁺-клеток в M-MDSC, не влияя на общее количество MDSC [29]. Интересно, что AFP и Gd, в отличие от hCG, также не увеличивали общую популяцию MDSC, однако все белки оказывали влияние на субпопуляцию M-MDSC. Показано, что все изучаемые фетоплацентарные белки не влияли на дифференцировку PMN-MDSC и Arg1, что указывает на особенность разработанной модели конверсии MDSC из CD11b⁺-клеток. Что касается продукции цитокинов, то в отличие от hCG белки AFP и Gd имели влияние на продукцию цитокинов миелоидными супрессорными клетками, при этом гликоделин подавлял выработку провоспалительных цитокинов IFN- α 2, IL-26, IL-19, TWEAK (данные не опубликованы), а AFP – регуляторного IL-19 [30, 31].

Таким образом, фетоплацентарные белки способны регулировать дифференцировку MDSC, преимущественно индуцируя развитие M-MDSC, а также ряд функциональных параметров (IDO, Arg1, цитокины), что дает нам основание предполагать, что это новый аспект формирования иммунной толерантности в период беременности. Известно, что именно перечисленные параметры (IDO, Arg1, цитокины) играют чрезвычайно важную роль в реализации иммунорегуляторных эффектов MDSC во время беременности [32].

В целом мы показали способность hCG действовать как иммунорегуляторная молекула, поскольку показано его влияние на дифференцировку MDSC, реализуя свои эффекты на уровне M-MDSC.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-415-590001 и в рамках НИОКТР АААА-А19-119112290007-7.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lutz M.B., Eckert I.N. 2021. Comments on the ambiguity of selected surface markers, signaling pathways and omics profiles hampering the identification of myeloid-derived suppressor cells. *Cell. Immunol.* **364**, 104347. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104347>
2. Köstlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marmé A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., C. Gille. 2014. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* **44** (9), 2582–2591. <https://doi.org/10.1002/eji.201344200>
3. Пономарев А.В. 2016. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика. *Иммунология.* **37** (1), 47–50. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-1-47-50>
4. Ostrand-Rosenberg S. 2018. Myeloid derived-suppressor cells: Their role in cancer and obesity. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.007>
5. Kumar V. Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D. 2016. The Nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trend. Immunol.* **37**, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
6. Nair R.R., Sinha P., Khanna A., Singh K. 2015. Reduced myeloid-derived suppressor cells in the blood and endometrium is associated with early miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73** (6), 479–486. <https://doi.org/10.1111/aji.1235>
7. Харченко Е.П. 2011. Толерантность матери и плода как проявление регуляторного континуума и пластичности их иммунных систем. *Мед. иммунология.* **13** (2–3), 121–132. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-2-3-121-132>

8. Paulesu L., Rao C.V., Ietta F., Pietropolli A., Ticconi C. 2018. hCG and Its disruption by environmental contaminants during human pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (3), 914. <https://doi.org/10.3390/ijms19030914>
9. Giaglis S., Stoikou M., Grimolizzi F., Subramanian B.Y., Shane V.B., Hoesli I., Lapaire O., Hasler P., Than N.G., Hahn S. Neutrophil migration into the placenta: Good, bad or deadly? *Cell Adh. Migr.* **10** (1–2), 208–225. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1148866>
10. Hahn S., Giaglis S., Hoesli I., Hasler P. 2012. Neutrophil NETs in reproduction: From infertility to pre-eclampsia and the possibility of fetal loss. *Front. Immunol.* **3**, 362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00362>
11. Rami D., La Bianca C., Zauli G., Radillo O., Bulla R. 2014. The First trimester gravid serum regulates procalcitonin expression in human macrophages skewing their phenotype in vitro. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/248963>
12. Furcron A., Romero R., Mial T. N. [et al.]. 2016. Human chorionic gonadotropin has anti-inflammatory effects at the maternal-fetal interface and prevents endotoxin-induced preterm birth, but causes dystocia and fetal compromise in mice. *Biol. Reprod.* **94** (6), 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139345>
13. Gaynor L.M., Colucci F. 2017. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front. Immunol.* **8**, 467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
14. Tsampalas M., Gridelet V., Berndt S., Foidart J.-M., Geenen V., Hauterive S.P. 2010. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* **85** (1), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.11.008>
15. Zamorina S.A., Shirshv S.V. 2013. Human chorionic gonadotropin is a factor in the induction of immune tolerance in pregnancy. *Immunologia.* **34** (2), 105–107.
16. Заморина С.А., Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Раев М.Б., Черешнев В.А. 2021. Влияние альфа-фетопротеина на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* **501** (1), 569–572. <https://doi.org/10.31857/S2686738921060184>
17. Cole L.A. 2012. hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10** (1), 24. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-24>
18. Hu C., Zhen Y., Pang B., Lin X., Yi H. 2019. Myeloid-derived suppressor cells are regulated by estradiol and are a predictive marker for IVF outcome. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **10**, 521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00521>
19. Pan T., Zhong L., Wu S., Cao Y., Yang Q., Cai Z., Cai X., Zhao W., Ma N., Zhang W. 2016. 17 β -Oestradiol enhances the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells via signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 signalling in human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* **185** (1), 86–97.
20. Fallarino F., Grohmann U., Bianchi V.C.R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **9** (10), 1069–1077. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401073>
21. Fletcher M., Ramirez M., Sierra R.A., Raber P., Thevenot P., Khani A.A., Sanchez-Pino D., Hernandez C., Wyczechowska D.D., Ochoa A.C., Rodriguez P.C. 2015. l-Arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **75** (2), 275–283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1491>
22. Bansal V., Ochoa J.B. 2003. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **6**, 223–228. <https://doi.org/10.1097/00075197-200303000-00012>
23. Cook P.C., Jones L.H., Jenkins S.J., Wynn T.A., Allen J.E., MacDonald A.S. 2012. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4⁺ T-cell polarization in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 9977–9982. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121231109>
24. Bronte V., Cingarlini S., Apolloni E., Serafini P., Mari-go I., De Santo C., Macino B., Marin O., Zanovello P. 2003. Effective genetic vaccination with a widely shared endogenous retroviral tumor antigen requires CD40 stimulation during tumor rejection phase. *J. Immunol.* **171**, 6396–6405.
25. Bian Z., Abdelaal A.M., Shi L., Liang H., Xiong L., Kidder K., Venkataramani M., Culpepper C., Zen K., Liu Y. 2018. Arginase-1 is neither constitutively expressed in nor required for myeloid-derived suppressor cell-mediated inhibition of T-cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **48** (6), 1046–1058. <https://doi.org/10.1002/eji.201747355>
26. Saito S., Nakashima A., Shima T., Mika I. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63** (6), 601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852>
27. Mauti L.A., Le Bitoux M., Baumer K. 2011. Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *J. Clin. Invest.* **121** (7), 2794–2807. <https://doi.org/10.1172/JCI41936>
28. Underwood J.L., Ruzkiewicz M., Barnden K.L. 1985. Does antigenic modulation cause the absence of major histocompatibility complex antigens on the syncytiotrophoblast? *Transplant. Proc.* **17**, 921–924.
29. Тимганова В.П., Шардина, К.Ю., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Усанина Д.И., Заморина С.А. 2023. Влияние трофобластического β 1-гликопротеина на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток. *Мед. иммунология.* **25** (3), 1179–1186. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOP-2838>
30. Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиюк С.В., Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б. 2021. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток. *Мед. иммунология.* **23** (4), 641–646. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-ROG-2209>
31. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Черешнев В.А. 2023. Альфа-фетопротеин как фактор дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* (В печати).
32. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б., Черешнев В.А. 2022. Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности. *Цитология.* **64** (2), 116. <https://doi.org/10.31857/S0041377122020067>

Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Differentiation and Functional Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells

K. Yu. Shardina¹, *, V. P. Timganova¹, M. S. Bochkova¹, S. V. Uzhviyuk¹, S. A. Zamorina¹

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

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

The effect of recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) at concentrations of 10 and 100 MU/mL, typical for pregnancy, on differentiation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) was investigated. The subject of the study was isolated cells CD11b⁺ that acquired the MDSC phenotype as a result of two-step activation with cytokines GM-CSF and IL-1 β and lipopolysaccharide (LPS). It was shown that hCG at both concentrations significantly increased the total MDSC pool and at a lower concentration (10 IU/mL) promoted differentiation of the M-MDSC subpopulation. At the same time, 100 MU/mL hCG had no effect on the expression of arginase-1 and indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) in MDSCs, but at a concentration of 10 IU/mL there was a tendency to increase IDO expression under the influence of hCG. When the cytokine profile was evaluated by multiplex analysis using Luminex xMAP technology, it was found that hCG did not modulate cytokine production in the CD11b⁺ cell culture. Thus, this work demonstrates for the first time that hCG can induce MDSC differentiation.

Keywords: myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), *in vitro* cultivation, human chorionic gonadotropin (hCG), CD11b⁺ cells, IDO, Arg1